

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Universität München

Vorstand der Abteilung:
Professor Dr. med. Werner Lang

DIFFERENZIERUNG SPEZIFISCHER UND KREUZREAGIERENDER
ANTIKÖRPER BEI DER ECHINOKOKKOSE MITTELS SDS-POLY-
ACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE UND IMMUNOBLOT

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ingrid Meier

aus

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Lang

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn
Prof. Dr. F. Deinhardt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Th. Löscher

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	5
2. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	9
3. MATERIAL UND METHODIK	10
3.1 Antigenherstellung	10
3.1.1 Echinococcus granulosus	10
3.1.2 Antigen 4/5 (AG 4/5)	10
3.1.3 Echinococcus multilocularis	10
3.1.4 Onchocerca volvulus	11
3.2 Seren	11
3.2.1 Humanseren	11
3.2.2 Anti Arc 4 Hyperimmunserum (4HI)	12
3.2.3 Monoklonales Antiserum (Maus) gegen Arc 5 Antigen (MAB 5)	12
3.2.4 Anti P ₁ - Seren	12
3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	12
3.3.1 Probenvorbereitung	12
3.3.1.1 Standard	12
3.3.1.2 Antigen	13
3.3.2 Elektrophorese	14
3.3.3 Weiterbearbeitung des Gels	14
3.3.3.1 Fixierung, SDS-Entfernung, Färben (Coomassie-Blau und Silber), Entfärben	14
3.3.3.2 Western-Blot	15
3.4 Auswertung	17
4. ERGEBNISSE	19
4.1 Vergleich von Coomassie-Blau-Färbung und Silber-Färbung in 4-30%igem SDS-Polyacrylamidgel	19
4.1.1 Molekulargewichtsbestimmung	19
4.1.1.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	19

4.1.1.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	19
4.1.1.3	Antigen 4/5 mit 1 % SDS	19
4.1.1.4	Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	20
4.1.1.5	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	20
4.1.1.6	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	20
4.1.2	Vergleich von E. granulosus-Antigen verschiedener Herkunft in 4-30%igem Polyacrylamidgel (E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol)	21
4.1.3	Vergleich von E. granulosus- und E. multilocularis-Antigen in 4-30 %igem Polyacrylamidgel in der Silber-Färbung	21
4.1.3.1	Antigene mit 1 % SDS	21
4.1.3.2	Antigene mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	21
4.2	Immunoblot mit homologen Seren	21
4.2.1	E. granulosus-Patienten	21
4.2.1.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	21
4.2.1.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	22
4.2.1.3	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	22
4.2.1.4	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	22
4.2.2	E. multilocularis-Patienten	22
4.2.2.1	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	22
4.2.2.2	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	23
4.2.2.3	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	23
4.2.2.4	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	23
4.2.3	Kreuzreaktionen bei E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten im Immunoblot	23
4.2.3.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	23
4.2.3.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	24
4.2.3.3	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	24
4.2.3.4	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	24
4.2.4	Zuordnung der Proteine im 4-30%igen Polyacrylamidgel (Coomassie-Blau-, Silber-Färbung) zu im Immunoblot erkannten Antigenen	24
4.2.4.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	24
4.2.4.2	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	24
4.2.4.3	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	25
4.2.4.4	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	25

4.3	Immunoblot mit heterologen Seren	25
4.3.1	Negativ-Kontrollen	25
4.3.1.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	25
4.3.1.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	25
4.3.1.3	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	26
4.3.1.4	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	26
4.3.2	Filariose-Patienten	26
4.3.2.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	26
4.3.2.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	26
4.3.3	Patienten mit sonstigen Parasitosen	27
4.3.3.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	27
4.3.3.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	27
4.3.4	Spezifische Antigene bei E. granulosus	27
4.4	Charakterisierung einzelner Antigene und Antigenfraktionen mittels Immunoblot	28
4.4.1	Antigen 4/5	28
4.4.1.1	Antigen 4/5 mit 1 % SDS	28
4.4.1.2	Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	28
4.4.2	Immunoblots mit Anti Arc 4 Hyperimmunserum (4HI)	28
4.4.2.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	28
4.4.2.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	28
4.4.2.3	Antigen 4/5 mit 1 % SDS	29
4.4.2.4	Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	29
4.4.2.5	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	29
4.4.2.6	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	29
4.4.3	Immunoblots mit monoklonalen Antikörpern gegen Arc 5 Antigen (MAB 5)	29
4.4.3.1	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	29
4.4.3.2	E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	30
4.4.3.3	Antigen 4/5 mit 1 % SDS	30
4.4.3.4	Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	30
4.4.3.5	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS	30
4.4.3.6	E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	30

	Seite
4.4.4 Immunoblots mit Antiseren (Human, Ziege, Schaf) gegen P ₁ -Antigen	
4.4.4.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS	30
4.4.4.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	31
4.5 Immunoblot mit Onchocerca volvulus-Antigen	31
4.5.1 Vergleich von Filariose-, E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten	31
4.5.1.1 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS	31
4.5.1.2 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	31
4.5.2 Vergleich von Onchozerkose-, D. perstans-, Strongyloidiasis- und Ankylostomiasis-Patienten	32
4.5.2.1 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS	32
4.5.2.2 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol	32
4.5.3 Spezifische Antigene bei O. volvulus	33
Abbildungen und Tabellen	34 - 86
5. DISKUSSION	87
5.1 Zuverlässigkeit und Aussagekraft der Untersuchung	87
5.1.1 Antigenherstellung	87
5.1.2 Seren	88
5.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblot	89
5.2 Vergleich mit anderen Untersuchungen	90
5.3 Schlußfolgerungen	94
6. ZUSAMMENFASSUNG	96
7. LITERATURVERZEICHNIS	98
Lebenslauf	107

1. EINLEITUNG

Die Echinokokkose des Menschen wird vorwiegend durch zwei Arten, nämlich *Echinococcus granulosus* (zystische Echinokokkose) und *Echinococcus multilocularis* (alveoläre Echinokokkose) verursacht. Daneben gibt es noch weitere Echinokokkenarten von zum Teil fraglicher humanpathogener Bedeutung in Südamerika (*E. vogeli*, *E. oligarthrus*). Der Mensch wird als Zwischenwirt mit dem Finnengewebe der Echinokokken befallen.

Die zystische Echinokokkose tritt vorwiegend in der Leber und der Lunge (je 44 %) auf und kann in Einzelfällen in sämtlichen Organen vorkommen (22, 33). Die alveoläre Echinokokkose ist fast ausschließlich auf die Leber begrenzt mit gelegentlicher sekundärer Aussaat per continuitatem. In seltenen Fällen kommt es zu einer hämatogenen oder lymphogenen Ausbreitung. *E. granulosus* bildet in den meisten Fällen gut abgrenzbare Zysten, während *E. multilocularis* infiltrativ destruierend ähnlich wie ein maligner Tumor wächst. *E. granulosus* ist ubiquitär verbreitet und kommt besonders in Schafzuchtgebieten vor, während *E. multilocularis* auf die nördliche Hemisphäre begrenzt ist.

Sowohl bei der zystischen wie auch bei der alveolären Echinokokkose hat die Immundiagnostik einen besonders wichtigen Stellenwert, da die parasitologische Diagnose gewöhnlich nur operativ zu erreichen ist und diagnostische Punktionen bzw. Biopsien wegen der Gefahr der Anaphylaxie und sekundären Aussaat kontraindiziert sind. Auch radiologische Diagnostik, Sonographie und Computertomographie (30) ergeben nur einen Verdacht auf Echinokokkose und ermöglichen keine beweisende Aussage.

Zur Diagnose der Echinokokkose stehen verschiedene immunologische Nachweisverfahren zur Verfügung, mit deren Hilfe über 90 % der an Echinokokkose erkrankten Patienten erfaßt werden können.

Dabei sollten mindestens zwei verschiedene Tests angewandt werden. Ein negativer serologischer Test schließt allerdings eine Echinokokkose nicht aus. Ursache für unterschiedliche Sensitivität bzw. Spezifität sind Zusammensetzung der Antigene sowie Lokalisation und Zustand des Finnenstadiums. Der Antigengehalt der Hydatidenflüssigkeit und der Membranextrakte variiert erheblich (11) und beeinflusst zusammen mit dem Zustand der Zystenwand die Antikörperbildung (79). Sie ist bei Lungenzysten oft schwächer als bei Leberzysten (5, 15, 44, 45, 71). Kinder unter 7 Jahren und Schwangere reagieren ebenfalls schwächer (56). Die Spezifität der antigenenthaltenden Substanzen wird auch durch den Gehalt an Wirtskomponenten beeinträchtigt (18, 19, 20, 51). Kagan (38) vermutet, daß die Schwankung in der Sensitivität der einzelnen Tests nicht nur von den Unterschieden in der Aufbereitung des Antigens, sondern auch von den Unterschieden in der Interaktion zwischen dem Wirt und der lokalen Art des *E. granulosus* abhängig ist (Sensitivität des IHA: 84 % positiv in Frankreich (60), 86 % in Italien (49), 93 % in USA (35)).

Folgende Tests wurden bisher zum Nachweis einer Echinokokkose verwendet:

- Intracutantest (Casoni-Test) (16)
- Komplement-Bindungsreaktion (KBR) (42)
- Indirekte Hämagglutination (IHA; PH) (25)
- Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT; IFAT) (2)
- Immunelektrophorese (IEP) (15)
- Latex-Agglutinations-Test (LAT) (78)
- Immunelektrodiffusion (IED) (54)
- Enzyme-linked-immunelektrodiffusion-assay (ELIDA) (56)
- Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) (24, 68)
- Solid-Phase-Radioimmunoassay (SPR) (49)
- Double Diffusion (DD) (1)
- Radioallergosorbent Test (RAST) (34)

Der Intracutantest und die KBR sollten wegen der geringen Empfindlichkeit und der relativ häufigen unspezifischen Reaktionen nicht

mehr angewandt werden (5, 37, 38, 62). Tests wie IHA, IIFT bzw. IFAT, LA, ELISA, RAST haben eine hohe Empfindlichkeit, zirkulierende Antikörper zu erkennen (24, 32, 36, 55, 56, 64, 69, 80). Die Anwendung von mindestens zwei serologischen Tests erhöht die diagnostische Sicherheit.

Kreuzreaktionen werden beschrieben bei Infektionen mit anderen Helminthen (3, 4, 9, 14, 15, 17, 26, 38, 62, 63, 69, 76, 82):

- Cestoden (v.a. Zystizerkose)
- Trematoden (v.a. Schistosomiasis)
- Nematoden (v.a. Filariosen und Darmnematoden wie Strongyloidosis, Ankylostomiasis, Trichinellose)

Diese Kreuzreaktionen können nach einer Untersuchung von Speiser (69) durch vorherige Absorption der Seren mit dem nicht korrespondierenden Antigen ohne Empfindlichkeitsverlust reduziert werden.

Mannweiler (45) fand Kreuzreaktionen bei Patienten mit anderen Lebererkrankungen (Zirrhose) und Tumorerkrankungen, Schantz (62) außerdem bei Vorliegen von Ovarialzysten.

Cameron und Staveley (13) berichteten 1957 über das Vorhandensein einer Substanz in der Zystenflüssigkeit bei der Echinokokkose, die antigenetische Verwandtschaft mit dem Blutgruppenantigen P_1 beim Menschen aufweist. Über die Isolierung und Charakterisierung des P_1 -Antigens berichteten Morgan und Watkins (47, 48) und Russi (61). Riadh ben-Ismaïl et al. (8) fanden Anti- P_1 -Antikörper bei *E. granulosus*- und *Fasciola hepatica*-Patienten.

Eine immunologische Unterscheidung zwischen *E. granulosus* und *E. multilocularis* ist wegen der vielfältigen Antigengemeinschaften mit den o.g. serologischen Methoden schwierig. Zwar kann aufgrund einer häufig stärkeren Reaktion mit dem homologen Antigen mittels IHA und ELISA zwischen einem Kollektiv von *E. granulosus*- und einem von *E. multilocularis*-Patienten statistisch unterschieden werden, im Einzelfall ist eine Differenzierung jedoch nicht zuverlässig (46). Hess et al. (32) beschrieben, daß die simultane An-

wendung von passiver Hämagglutination (PH) und indirekter Immunfluoreszenz (IF) eine durchschnittliche Sensitivität von 96 % ergibt, eine hohe Spezifität garantiert und Hinweise auf die Differentialdiagnose zwischen *E. granulosus* und *E. multilocularis* ermöglicht. Die Titer von IF und PH wurden in einem Diagramm zueinander in Beziehung gesetzt und es war in 88 % der *E. granulosus*-Patienten und 81 % der *E. multilocularis*-Patienten möglich, serologisch die richtige Artdiagnose zu stellen.

Capron et al. (14) beschrieben in der Immunelektrophorese ein Antigen (Antigen 5 = Arc 5), das zunächst für *E. granulosus*-spezifisch gehalten wurde. Varela-Diaz et al. (75, 76), Yarzabal (81) und Schantz et al. (63) konnten Arc 5 jedoch auch bei *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *Taenia solium* und fraglich bei Multiplen Myelom nachweisen. Somit scheint es sich bei Arc 5 um ein weitgehend genussspezifisches Antigen zu handeln. Allerdings bilden einige Patienten, vor allem bei alveolärer Echinokokkose keine Antikörper gegen dieses Antigen.

Gottstein (28) hat in Untersuchungen 1983 eine spezifische Antigenfraktion für *E. multilocularis* (Em2) beschrieben, die durch immunabsorptive Reinigung mit Entfernung eines Großteils der antigenetischen Komponenten, die beide Parasiten gemeinsam haben, eine serologische Differentialdiagnose bei 80 - 90 % der Patienten mit alveolärer Echinokokkose erlaubt. Durch eine weitere Reinigung konnte ein spezifisches Antigen (Em2a) isoliert werden, das sich in der Auftrennung mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) als einheitliches Protein (isoelektrischer Punkt: 4.8, Molekulargewicht: 54.000) zeigte (29). Gottstein fand keine Kreuzreaktionen mit *E. granulosus* und anderen Helmintheninfektionen mit diesem gereinigten Antigen. 94 % der *E. multilocularis*-Serum reagierten positiv mit Em2a.

2. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Wie bereits ausgeführt, können bei der Serodiagnostik der Echinokokkose zahlreiche falsch positive Reaktionen auftreten, die durch Kreuzreaktionen mit anderen Helmintheninfektionen, insbesondere Filariosen und durch unspezifische Reaktionen mit immunologisch verwandten Antigenen wie dem Blutgruppenantigen P_1 bedingt sind. Zudem bestehen zwischen zystischer und alveolärer Echinokokkose ausgedehnte Kreuzreaktionen. Ein für die *E. granulosus*-Infektion spezifisches Antigen ist bisher nicht bekannt.

Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

1. Welche Echinococcus-Antigene sind für Kreuzreaktionen mit anderen Helminthiasen, insbesondere Filariosen verantwortlich?
2. Welche Antigene sind für unspezifische Reaktionen verantwortlich?
3. Gibt es spezifische Antigene gegen die nur von Patienten mit Echinokokkose Antikörper gebildet werden?
4. Gibt es für die *E. granulosus*-Infektion spezifische Antigene, die eine Differenzierung von *E. multilocularis*-Infektionen ermöglichen?

Zur Klärung dieser Fragen sollten

1. Antigene von *E. granulosus*, *E. multilocularis* und *O. volvulus* in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt werden,
2. an den elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragenen (Western-Blot) Antigenen die immunologische Bindung von IgG-Antikörpern bei Patienten mit zystischer und alveolärer Echinokokkose, Filariose, Schistosomiasis, Zystizerkose, Strongyloidiasis und Ankylostomiasis untersucht werden,
3. sowie die immunologische Bindung von Antiseren verschiedener Herkunft gegen das P_1 -Blutgruppenantigen nachgewiesen werden.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 Antigenherstellung

3.1.1 Echinococcus granulosus

a) "Ankara" (Rind) Antigen nach Varela-Diaz (74)

Dieses Antigen wurde in der Türkei (Schlachthof Ankara) steril aus fertilen Zysten in Lunge und Leber von Rindern entnommen, zentrifugiert, in Dialyseschläuchen (Fa. Serva) gegen Polyethylenglycol 20.000 (PEG 20.000) konzentriert (Proteinkonzentration 13 mg/ml) und lyophilisiert.

b) "Merieux" (Schaf) Antigen

Dieses Antigen wurde von der Firma Bio Merieux aus fertilen Zysten vom Schaf (Marokko) hergestellt und lyophilisiert.

c) "Pasteur" (Schaf) Antigen

Die Firma Pasteur hat dieses Antigen ebenfalls aus fertilen Zysten vom Schaf gewonnen und lyophilisiert.

3.1.2 "Antigen 4/5" (AG 4/5) nach Oriol (52), Pozzuoli (59), Piantelli (53)

Es wurde lyophilisiertes E. granulosus-Antigen "Ankara" verwendet, 130 mg Antigen in 10 ml Aqua dest. aufgelöst, bei 4°C auf dem Magnetrührer gegen 0.005 M Acetatpuffer (pH 5) über Nacht dialysiert, 1 Stunde bei 50.000 g bei 4°C zentrifugiert, das Sediment in Phosphat-Puffer 0.2 M (pH 8) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) aufgelöst, mit 40 % gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgesalzt (4 Teile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung und 6 Teile AG-Lösung), 1 Stunde bei 23°C auf den Magnetrührer gestellt und über Nacht bei 4°C stehengelassen, am nächsten Tag mit 12.000 Rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand gegen Phosphat-Puffer (s.o.) über Nacht bei 4°C dialysiert.

3.1.3 Echinococcus multilocularis nach Kagen et al. (38)

Bei diesem Antigen wurde der Stamm "Stuttgart" (isoliert 1976 vom Fuchs/Schwäbische Alb) verwendet und auf NMRI-Mäuse durch intraperitoneale Verimpfung von Larvengewebe jeweils im Abstand von

6 Monaten passagiert. Das Larvengewebe wurde entnommen, zu ca. 8 g Larvengewebe (Naßgewicht mit Zystenflüssigkeit) wurde 20 ml PBS gegeben. Das Gewebe wurde mit der Schere und anschließend im Ultra-Turrax 5 x 10 Sekunden unter Kühlung zerkleinert, über Nacht eingefroren bei -80°C, dann 10 Minuten bei 3.000 U zentrifugiert, der Überstand 1 Stunde bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert, die beiden Sedimente im Ultra-Turrax mit 10 ml PBS ca. 5 x 10 Sekunden zerkleinert, 2 Stunden homogenisiert, dann nochmals 1 Stunde bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert, das Sediment erneut mit Ultra-Turrax zerkleinert und 30 Minuten homogenisiert. Anschließend 5 x 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Branson Ultrasonic, 50 Watt) und über Nacht bei 4°C auf den Magnetrührer gestellt, dann 1 Stunde bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert. Die Überstände der 20.000 g - Zentrifugationen wurden kombiniert und lyophilisiert.

3.1.4 Onchocerca volvulus

Die Antigenherstellung erfolgte nach einer Modifikation (77) der Methode von Schulz-Key et al. (66): Onchozerkome wurden bei Onchozerkose-Patienten exstirpiert (Leprazentrum Wau/Südsudan) und eingefroren nach München transportiert. Die Onchozerkome wurden mittels Kollagenase verdaut, die freigesetzten Adultwürmer homogenisiert, ultraschallbehandelt und hochtourig zentrifugiert (siehe 3.1.3).

3.2 Seren

3.2.1 Humansenen

Es wurden Seren von Patienten mit positiver Reaktion im Echinokokkose-ELISA (mit E. granulosus-Antigen "Ankara") verwandt. Soweit nicht anders vermerkt, handelte es sich um deutsche Patienten mit parasitologisch gesicherter Monoinfektion:

- 20 Patienten mit zystischer Echinokokkose (Süd- und Osteuropa)
- 7 Patienten mit alveolärer Echinokokkose
- 8 Patienten mit Onchozerkose
- 14 Patienten mit Onchozerkose (Südsudan)
- 3 Patienten mit Schistosomiasis
- 2 Patienten mit Zystizerkose
- 2 Patienten mit Strongyloidiasis
- 2 Patienten mit Dipetalonema perstans-Infektion
- 2 Patienten mit Ankylostomiasis

sowie 10 Seren von deutschen Personen ohne bisherige parasitäre Erkrankung und negativer Reaktion im Echinokokkose-ELISA.

3.2.2 Anti Arc 4 Hyperimmunserum (4HI) nach Lauriola (41), Musiani (50)
4HI wurde hergestellt durch Erhitzen von AG 4|5 (siehe 3.1.2) 15 Minuten 100°C zur irreversiblen Denaturierung von Antigen 5, anschließend zentrifugiert und mit dem Überstand (Arc 4 Antigen) ein Kaninchen immunisiert (Tag 0: 1 mg Proteingehalt in komplettem Freud'schen Adjuvans; Tag 20 und 30: Booster in inkomplettem Freud'schen Adjuvans). Die Überprüfung des Hyperimmunserums erfolgte mittels Immunelektrophorese; dabei waren keine Antikörper gegen Antigen 5 nachweisbar.

3.2.3 Monoklonales Antiserum (Maus) gegen Arc 5 Antigen (MAB 5)
MAB 5 wurde von Capron, Pasteur-Institut Lille, Frankreich zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Anti P₁ Seren
Es wurden Anti P₁ Seren vom Menschen und der Ziege von der Firma Biotest, Anti P₁ Seren vom Schaf von den Behringwerken verwendet.

3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)
Die Elektrophorese wurde nach Anleitung der Firma Pharmacia "Polyacrylamide Gel Electrophoreses laboratory techniques" unter Verwendung des Gel Elektrophorese Apparates GE 214 und der Gradienten-Gele der Firma Pharmacia Polyacrylamidgele 4-30% (PAA 4|30) durchgeführt. Die Wahl des Gradientengels hing von dem Molekulargewichten der Probe ab. Die PAA 4|30 Gele trennen Proteine mit einem Molekulargewicht von 50.000 bis 2.000.000 D auf. Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 2.000.000 werden nicht vom Gel aufgenommen, Proteine kleiner als 50.000 können evtl. aus dem Gel wandern. Es wurde die SDS-Gradienten-Page durchgeführt.

3.3.1 Probenvorbereitung
Probenpuffer: 0.01 M Tris, 0.001 M EDTA, 1% SDS, pH 8.0

3.3.1.1 Standard
Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden lyophilisierte, hochge-

reinigte Proben der Firma Pharmacia verwendet und zwar:

HMW (High Molecular Weight)

LMW (Low Molecular Weight)

HMW enthält:	Thyroglobin	MG	330.000
	Ferritin (half unit)	MG	220.000
	Albumin	MG	67.000
	Catalase	MG	60.000
	Lactat-Dehydrogenase	MG	36.000
	Ferritin	MG	18.500
LMW enthält:	Phosphorylase b	MG	94.000
	Albumin	MG	67.000
	Ovalbumin	MG	43.000
	Carboanhydrase	MG	30.000
	Trypsin Inhibitor	MG	20.100
	a-Lactalbumin	MG	14.400

Für die SDS-PAGE wurde (nach Anleitung der Firma Pharmacia "Calibration Kits for Molecular Weight Determination using Electrophoresis") der Standard wie folgt vorbereitet:

LMW: Zugabe von 100 µl Probenpuffer mit 2,5 % SDS, 5 % Mercaptoethanol und 0,5 µl einer 1%igen Bromphenolblaulösung, unter leichtem Schütteln vermischen und 5 Minuten bei 100°C erhitzen.

HMW: Zugabe von 100 µl Probenpuffer mit 1 % SDS, 1 % Mercaptoethanol und 0.5 µl einer 1%igen Bromphenolblaulösung, unter leichtem Schütteln vermischen und 15 Minuten bei 65°C erhitzen.

3.3.1.2 Antigen

Das lyophilisierte Antigen wurde je zur Hälfte mit H₂O dest. und Probenpuffer (SDS der Probe: 1 %) rekonstituiert. Um die Dichte der Probe zu erhöhen wurde 1/4 des Volumens 40%iges Glycerol dazugegeben. Das Antigen wurde dann für 15 Minuten auf 65°C zur Denaturierung und Reduzierung der Wirtsproteine erhitzt. Bei einem Teil der Proben wurde 5 % Mercaptoethanol dazugegeben.

Proteingehalt: <i>E. granulosus</i> (Ankara, Merieux, Pasteur)	5 mg/ml
<i>E. multilocularis</i>	10 mg/ml
<i>Onchocerca volvulus</i>	6 mg/ml

3.3.2 Elektrophorese

Als Puffer für die Elektrophorese wurde nach Anleitung der Firma Pharmacia verwendet:

0.04 M Tris, 0.02 M Natriumacetat, 0.002 M EDTA, 0.2 % SDS, pH 7,4

Elektrophoresebedingungen

- Vorlauf: PAA 4|30 Gradientengel 1 Stunde bei 70 V unter Kühlung bei + 10°C (3,1 l Puffer)
- Probenauftragung: Entfernung der Luftblasen aus den Probenschlitzen mit einer Pasteurpipette. Auftragung von jeweils 5 µl (Standard und Antigen)
- Elektrophorese bei 300 V für 10 Minuten und anschließend bei 150 V für 5 Stunden (ca. 610 AStd.)

Während der Probenauftragung und der initialen Elektrophorese (300 V für 10 Minuten) wurde die Pufferzirkulation nur auf das untere Reservoir eingestellt, beim Vorlauf und der Elektrophorese (5 Stunden bei 150 V) erfolgte die Pufferzirkulation zwischen oberem und unterem Reservoir.

3.3.3 Weiterbearbeitung des Gels

3.3.3.1 Fixierung, SDS-Entfernung, Färben (Coomassie-Blau und Silber), Entfärben

Fixierung und SDS-Entfernung erfolgten elektrophoretisch bei 24 V für 30 Minuten in 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure und H₂O dest (2,4 l) mit dem Gel Destainer GD-4 II der Firma Pharmacia.

Zur Coomassie-Blau-Färbung wurde 0,1 % Coomassie-Blue R-250 in 25 % Methanol, 10 % Essigsäure und H₂O dest. (2,4 l) gelöst, diese Lösung jeweils vor Gebrauch gefiltert und ebenfalls elektrophoretisch bei 24 V für 45 Minuten mit dem GD-4 II gefärbt.

Das Entfärben erfolgte wiederum elektrophoretisch mit dem GD-4II bei 24 V für 45 Minuten in 25 % Methanol, 10 % Essigsäure und

H₂O dest. Nach ca. 25 Minuten wurde das Gel umgedreht und bei zu starkem Hintergrund über Nacht in der o.g. Entfärbelösung belassen.

Die Silber-Färbung erfolgte nach Heukeshoven und Dernick (persönliche Mitteilung):

Fixierung in 40 % Ethanol, 7 % Essigsäure über Nacht

2 x in 10 % Ethanol waschen (10 Minuten)

3 x in H₂O waschen (10 Minuten)

in 0,1 %ige AgNO₃-Lösung legen (45 Minuten)

H₂O (10 Sekunden)

Entwicklung: 3 % Na₂CO₃-Lösung mit 0,02 % Formaldehyd (20 Minuten)

stoppen mit 1 % Essigsäure (10 Minuten)

3 x in H₂O waschen (10 Minuten)

in Abschwächer nach Farmer 0,5 % legen bis Hintergrund entfärbt ist. Falls die Färbung zu schwach ist, Vorgang ab AgNO₃ wiederholen.

3.3.3.2 Western-Blot nach Towbin (72), Burnette (12), Tsang (73), Gürtler (persönliche Mitteilung)

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen und auf die vorbereitete, 1 Stunde in Blot-Puffer gewässerte Membran-Folie (pure Nitrocellulose-Folie von Bio Rad) gelegt, Gel und Nitrocellulose-Folie zwischen Filterpapier und Schaumstoff (Scotch Brite), beides ebenfalls vorher in Blot-Puffer gewässert, im Plastikgitter luftblasenfrei zusammengepreßt. Danach wurde das "Sandwich" in die mit Blot-Puffer gefüllte Trans-Blot TM Zelle von Bio Rad mit der Nitrocellulose-Folie zur Anode gegeben und 3,5 Stunden bei 350 mA und 90 V unter Rühren (Magnetrührer) und Kühlung (+10°C) mit Power Supply Modell 160/1,6 geblottet.

Blot-Puffer nach Towbin: 18 g Glycin, 3,75 g Tris-Base, 0,2 l Methanol auf 1.000 ml H₂O.

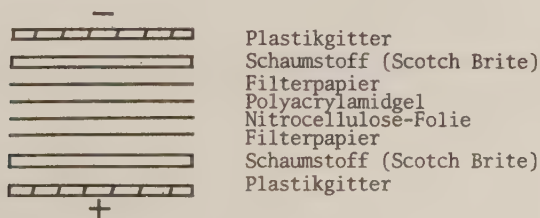


Abb. 1

Nach dem Blot wurde der Randstreifen mit dem Markerprotein (Standard) abgeschnitten und 5 Minuten in 7 %igem Amidoschwarz in 7,5 %iger Essigsäure gefärbt, mit Wasser abgespült und über Nacht in 7,5 % Essigsäure entfärbt.

Die Restfolie wurde in Streifen (ca. 4 mm) geschnitten und zum Absättigen der ungebundenen Ladungsstellen über Nacht in Cohen-Puffer gelegt (Kühlschrank) und nicht benötigte Streifen mit Cohen-Puffer eingefroren (-20°C).

Cohen-Puffer (in H₂O dest.): 0.1 % Ficoll 400, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon 350 (PVP 350), 0.1 % Nonidet 40 (NP 40), 1,5 % BSA, 0.05 % Gelatin, 10 ml 1 M Tris auf 500 ml pH 7.4, 10 ml Glycin auf 500 ml.

Immunoblot

Ein Streifen (s.o.) wurde in ein mit Silikonstopfen verschließbares Röhrchen gegeben.

- Inkubation mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur in 2 ml TBS (0.9 % NaCl, 0.01 M Tris pH 7.4) und 50 µl Serum
- 4 x waschen mit je 2 ml Waschsolution für wenigstens 15 Minuten
Waschsolution: 0.5 % Albumin, 0.2 % Gelatin, 0.05 % NP 40, 0.05 M Tris in 0.9 % NaCl
- Inkubation mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur in 2 ml TBS und 3,5 µl peroxidasemarkiertes Antihuman IgG vom Kaninchen (DAKO)
- 4 x waschen wie oben
- in Substratlösung geben und reagieren lassen (ca. 8 Minuten)
Substratlösung: 0.025 g Diaminobenzidine, 2.5 ml 1 M Tris-HCl pH 7.4, 50 ml H₂O, 50 µl H₂O₂ (3 %)
- Streifen mit Wasser spülen und trocknen lassen und mit Tesa-Film aufkleben

Streifen und Gele wurden zur Auswertung und Dokumentation fotografiert.

3.4 Auswertung

Zur Auswertung wurden Fotografien und die Original-Blot-Streifen verwendet. Nur eindeutig zu identifizierende Banden wurden graphisch aufgetragen und die Molekulargewichte mit Hilfe der Auftrennung der Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht folgendermaßen bestimmt:

- Messung der Trennstrecke der Standardproteine
- Berechnung der relativen Werte der Wanderung der Standardproteine (R_f)

$$R_f = \frac{\text{Strecke vom Auftragungspunkt zur jeweiligen Bande}}{\text{Trennstrecke der Standardproteine (vom Auftragungspunkt zur Bande mit dem kleinsten Molekulargewicht)}}$$

R_f wurde nach Anleitung der Firma Pharmacia auf log. mm Papier aufgetragen. Mit Hilfe der entstehenden Kurve (siehe Abb.2) konnte den entsprechenden Banden des Antigens ein Molekulargewicht zugeordnet werden. Alle Molekulargewichte wurden in Dalton (D) angegeben. Bei den Abbildungen (3 - 42) erfolgte die Molekulargewichtsangabe in 1.000 D.

Bei der Bestimmung der Molekulargewichte ist mit einer Fehlerbreite von $\pm 4 \%$ (31) zu rechnen.

Calibration Curve Established Using the HMW and LMW Calibration Kits on a Pharmacia PAA 4/30 Gradient Gel in SDS

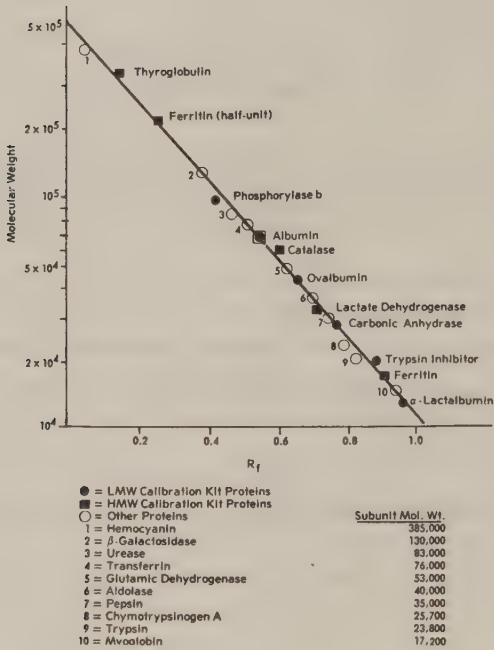


Abb. 2

4. ERGEBNISSE

4.1 Vergleich von Coomassie-Blau-Färbung und Silber-Färbung in 4-30 %igem SDS-Polyacrylamidgel

4.1.1 Molekulargewichtsbestimmung

4.1.1.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

In der Coomassie-Blau-Färbung des E. granulosus-Antigens mit 1% SDS konnten 14 Proteinbanden mit einem Molekulargewicht (= MG) von 18.500 - 210.000 identifiziert werden, während sich in der Silber-Färbung 21 Proteine (MG 12.500 - 210.000) darstellten. Davon waren jeweils 8 Banden nur in der Silber-Färbung und 1 Bande nur in der Coomassie-Blau-Färbung darstellbar, 12 Proteine stimmten in beiden Färbungen überein (Abb. 3, Tab. 1).

4.1.1.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei diesem Antigen konnten in der Coomassie-Blau-Färbung 22 (MG 12.500 - 130.000), in der Silber-Färbung 33 Proteinbanden (MG 12.500 - 310.000) dargestellt werden. Davon waren 12 Banden nur in der Silber-Färbung und 1 Bande nur in der Coomassie-Blau-Färbung sichtbar. 19 Banden waren in beiden Färbungen identisch (Abb. 4, Tab. 2).

In der Coomassie-Blau-Färbung fanden sich im Vergleich zur Auftrennung des E. granulosus-Antigens ohne Mercaptoethanol (siehe 1.1.1) 5 Proteinbanden (MG 26.000 - 67.000) und bei der Silber-Färbung 11 Banden (MG 12.500 - 210.000) mit identischem Molekulargewicht.

4.1.1.3 Antigen 4/5 mit 1 % SDS

In der Coomassie-Blau-Färbung konnten bei o.g. Antigen 10 Proteinbanden (MG 13.500 - 180.000), in der Silber-Färbung 19 Banden (MG 13.500 - 150.000) nachgewiesen werden. Davon waren 11 Banden nur in der Silber-Färbung und 2 Banden nur in der Coomassie-Blau-Färbung aufgetreten. 5 Banden waren in beiden Färbungen gemeinsam vorhanden (Abb. 5, Tab. 3).

Im Vergleich zum *E. granulosus*-Antigen (siehe 1.1.1) stellten sich die Proteinbanden in der Coomassie-Blau-Färbung zwischen den Molekulargewichten 52.000 und 58.000 beim AG 4/5 deutlich schwächer dar.

4.1.1.4 Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei diesem Antigen konnten in der Coomassie-Blau-Färbung 15 Proteinbanden (MG 14.000 - 140.000), in der Silber-Färbung 21 Banden (MG 14.000 - 210.000) dargestellt werden. 8 Banden kamen nur in der Silber-Färbung vor, 2 Banden nur in der Coomassie-Blau-Färbung. 11 Banden stimmten in beiden Färbungen überein (Abb. 6, Tab. 4).

In der Coomassie-Blau-Färbung waren im Vergleich zur Auftrennung von AG 4/5 ohne Mercaptoethanol 2 Banden, in der Silber-Färbung 7 Banden identisch.

Im Vergleich zum *E. granulosus*-Antigen mit Mercaptoethanol waren in der Coomassie-Blau-Färbung die Proteinbanden zwischen MG 65.000 und 67.000 beim AG 4/5 mit Mercaptoethanol deutlich schwächer.

4.1.1.5 *E. multilocularis*-Antigen mit 1 % SDS

In der Coomassie-Blau-Färbung stellten sich bei diesem Antigen 17 Proteinbanden (MG 11.500 - 67.000), in der Silber-Färbung 31 Banden (MG 11.500 - 350.000) dar. 16 Banden waren nur in der Silber-Färbung und 2 Banden nur in der Coomassie-Blau-Färbung zu sehen. 15 Banden waren bei beiden Färbungen identisch (Abb. 7, Tab. 5).

4.1.1.6 *E. multilocularis*-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

In der Coomassie-Blau-Färbung konnten 7 Proteinbanden (MG 14.500 - 220.000), in der Silber-Färbung 20 Banden (MG 12.500 - 350.000) nachgewiesen werden. Davon kamen 13 Banden nur in der Silber-Färbung vor, 7 Banden waren in beiden Färbungen identisch (Abb. 8, Tab. 6).

Im Vergleich zur Auftrennung des *E. multilocularis*-Antigens ohne Mercaptoethanol (siehe 1.1.5) fanden sich in der Coomassie-Blau-Färbung 2 Proteinbanden, in der Silber-Färbung 12 Banden mit gleichem Molekulargewicht.

- 4.1.2 Vergleich von *E. granulosus*-Antigen verschiedener Herkunft in 4-30%igem Polyacrylamidgel (*E. granulosus*-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol)

Bei den von verschiedenen Wirtstieren und unterschiedlicher geographischer Herkunft gewonnenem *E. granulosus*-Antigen ergaben sich in der Coomassie-Blau-Färbung 5 gemeinsame Proteinbanden (MG 14.000 - 67.000), in der Silber-Färbung 13 gemeinsame Banden (MG 12.500 - 310.000) (Abb. 9, Tab. 7).

- 4.1.3 Vergleich von *E. granulosus*- und *E. multilocularis*-Antigen in 4-30%igem Polyacrylamidgel in der Silber-Färbung

- 4.1.3.1 Antigene mit 1 % SDS

Es waren 5 identische Banden (MG 26.000 - 210.000) darstellbar, 3 Banden waren nur bei *E. granulosus* und 7 Banden nur bei *E. multilocularis* nachweisbar (Abb. 10, Tab. 8).

- 4.1.3.2 Antigene mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei diesen Antigenen waren 7 Proteinbanden identisch (MG 12.500 - 210.000), 17 Banden konnten nur bei *E. granulosus* und 4 Banden nur bei *E. multilocularis* dargestellt werden (Abb. 11, Tab. 9).

4.2 Immunoblot mit homologen Seren

- 4.2.1 *E. granulosus*-Patienten

- 4.2.1.1 *E. granulosus*-Antigen mit 1 % SDS

IgG-Antikörper waren gegen 9 Antigene (MG 49.000 - 255.000) bei allen Patienten nachweisbar, Antikörper gegen 10 weitere Antigene (MG 12.000 - 96.000) waren nur bei einem Teil der Patienten vorhanden (Abb. 12, Tab. 10).

4.2.1.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

IgG-Antikörper waren bei allen Patienten gegen 8 Antigene (MG 52.000 - 270.000) nachweisbar, Antikörper gegen 15 weitere Antigene (MG 13.500 - 285.000) waren nur bei einem Teil der Patienten vorhanden (Abb. 13, Tab. 11).

Im Vergleich zum E. granulosus-Antigen ohne Mercaptoethanol (siehe 4.2.1.1) waren 9 Antigene (MG 12.500 - 260.000) mit gleichem Molekulargewicht nachweisbar.

4.2.1.3 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

Gegen 5 Antigene (MG 11.500 - 180.000) wurden IgG-Antikörper bei allen Patienten gefunden, Antikörper gegen 3 weitere Antigene (MG 13.000 - 270.000) waren nur vereinzelt nachweisbar (Abb. 14, Tab. 12).

Beim Vergleich zum E. granulosus-Antigen (siehe 4.2.1.1) waren von den insgesamt 8 Antigenen 3 (MG 96.000 - 180.000) identisch.

4.2.1.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Hier stellten sich bei allen Patienten Antikörper gegen 4 Antigene (MG 57.000 - 85.000) dar, bei 5 weiteren Antigenen (MG 27.000 - 62.000) waren Antikörper nur vereinzelt vorhanden (Abb. 15, Tab. 13).

Beim Vergleich zum E. granulosus-Antigen mit Mercaptoethanol (siehe 4.2.1.2) waren von den insgesamt 9 Antigenen 2 (MG 52.000 und 57.000) identisch.

4.2.2 E. multilocularis-Patienten

4.2.2.1 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

Gegen 3 Antigene (MG 140.000 - 170.000) waren bei allen Patienten IgG-Antikörper nachweisbar, Antikörper gegen 4 weitere Antigene (MG 24.500 - 115.000) nur bei einem Teil der Patienten (Abb. 16, Tab. 14).

4.2.2.2 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

IgG-Antikörper gegen 4 Antigene (MG 26.000 - 75.000) konnten bei allen Patienten dargestellt werden, 8 weitere Antigene (MG 14.500 - 175.000) waren nur vereinzelt nachweisbar (Abb. 17, Tab. 15).

Im Vergleich zum E. multilocularis-Antigen ohne Mercaptoethanol (siehe 4.2.2.1) war 1 Antigen (MG 75.000) mit identischem Molekulargewicht nachweisbar.

4.2.2.3 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Gegen 8 Antigene (MG 48.000 - 260.000) wurden bei allen Patienten IgG-Antikörper gefunden, Antikörper gegen 7 weitere Antigene (MG 12.000 - 200.000) konnten vereinzelt nachgewiesen werden (Abb. 18, Tab. 16).

Im Vergleich zum E. multilocularis-Antigen (siehe 4.2.2.1) waren von den 15 Antigenen 2 (MG 115.000 und 140.000) identisch.

4.2.2.4 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

IgG-Antikörper gegen 13 Antigene (MG 34.000 - 270.000) konnten bei allen Patienten dargestellt werden, bei 10 Antigenen (MG 13.000 - 280.000) waren Antikörper nur bei einem Teil der Patienten gefunden worden (Abb. 19, Tab. 17).

Im Vergleich zum E. multilocularis-Antigen mit Mercaptoethanol (siehe 4.2.2.2) war von den 24 Antigenen 1 Antigen (MG 52.000) identisch.

4.2.3 Kreuzreaktionen bei E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten im Immunoblot

4.2.3.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Unter Berücksichtigung der methodischen Fehlerbreite der Molekulargewichtsbestimmung (siehe 3.4) wurden 8 Antigene (MG 48.000 - 260.000) sowohl von E. granulosus-Patienten als auch von E. multilocularis-Patienten erkannt. Gegen 6 weitere Antigene (MG 12.000 - 82.000) waren nur bei einem Teil der Patienten Antikörper nachweisbar. 3 Antigene (MG 90.000 - 230.000) waren nur bei E. granulosus-Patienten (12/20 von 20 Pat.) nachweisbar (Abb. 20, Tab. 18).

4.2.3.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei diesem Antigen wurden ebenfalls unter Berücksichtigung der methodischen Fehlerbreite (siehe 4.2.3.1) 9 Antigene (MG 52.000 - 270.000) sowohl von E. granulosus-als auch von E. multilocularis-Patienten erkannt. Gegen 15 weitere Antigene (MG 12.000 - 280.000) waren nur bei einem Teil der Patienten Antikörper nachweisbar. 2 Antigene (MG 36.000 und 80.000) waren nur von E. granulosus-Patienten (17/6 von 19 Pat.) erkannt worden (Abb. 21, Tab. 19).

4.2.3.3 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

3 Antigene (MG 140.000 - 180.000) konnten sowohl von E. granulosus-als auch von E. multilocularis-Patienten erkannt werden. 2 Antigene (MG 11.500 und 95.000) waren nur bei E. granulosus-Patienten nachweisbar, weitere 2 Antigene (MG 75.000 und 85.000) nur bei E. multilocularis-Patienten (4/6 von 7 Pat.) (Abb. 22, Tab. 20).

4.2.3.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

1 Antigen (MG 75.000) wurde von allen E. granulosus-und E. multilocularis-Patienten erkannt. Bei 3 weiteren Antigenen (MG 26.000 - 52.000) waren die Antikörper nur bei einem Teil der E. granulosus-und E. multilocularis-Patienten nachweisbar. Gegen 3 Antigene (MG 57.000 - 85.000) waren Antikörper nur bei E. granulosus-Patienten (6 von 6 Pat.) darstellbar (Abb. 23, Tab. 21).

4.2.4 Zuordnung der Proteine im 4-30%igen Polyacrylamidgel (Coomassie-Blau-, Silber-Färbung) zu im Immunoblot erkannten Antigenen

4.2.4.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

5 im Immunoblot erkannte Antigene (MG 62.000 - 175.000) konnten auch in den Proteinfärbungen nachgewiesen werden. 8 Antigene (MG 16.500 - 255.000) waren in den Proteinfärbungen nicht darstellbar. (Abb. 24, Tab. 22)

4.2.4.2 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

6 im Immunoblot erkannte Antigene (MG 24.500 - 170.000) konnten nur in der Silber-Färbung nachgewiesen werden. 1 Antigen (MG

85.000) war in den Proteinfärbungen nicht darstellbar (Abb. 24, Tab. 22).

4.2.4.3 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

14 im Immunoblot erkannte Antigene (MG 12.500 - 130.000) waren auch in den Proteinfärbungen nachweisbar. 5 Antigene (MG 185.000 - 285.000) konnten in den Proteinfärbungen nicht dargestellt werden (Abb. 25, Tab. 23).

4.2.4.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

2 im Immunoblot erkannte Antigene (MG 14.500 und 53.000) konnten auch in den Proteinfärbungen nachgewiesen werden. 5 Antigene (MG 33.000 und 110.000) waren in den Proteinfärbungen nicht darstellbar (Abb. 25, Tab. 23).

4.3 Immunoblot mit heterologen Seren

4.3.1 Negativ-Kontrollen

4.3.1.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Bei diesem Antigen konnten bei der Überschichtung mit Negativseren IgG-Antikörper gegen 4 Antigene (MG 49.000 - 180.000) bei allen Patienten nachgewiesen werden. 7 weitere Antigene (MG 82.000 - 255.000) wurden nur von einem Teil der Patienten erkannt. Somit waren 6 Antigene (MG 12.000 - 96.000) nur von E. granulosus-Patienten erkannt worden (Abb. 26, Tab. 24).

4.3.1.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei der Überschichtung mit Negativseren traten Antikörper gegen 2 Antigene (MG 115.000 und 125.000) bei allen E. granulosus-Patienten und bei allen Negativ-Kontrollen auf. 12 Antigene (MG 40.000 - 220.000) waren nur bei einem Teil der Patienten sowie der Negativ-Kontrollen erkannt worden. 1 Antigenbande (MG 60.000) stellte sich nur bei den Negativseren (6 von 10) dar (Abb. 27, Tab. 25).

4.3.1.3 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

Bei diesem Antigen waren Antikörper gegen 4 Antigene (MG 115.000 - 170.000) sowohl bei E. multilocularis-Patienten als auch bei den Negativ-Kontrollen nachweisbar. Antikörper gegen 3 Antigene (MG 24.500 - 85.000) waren nur bei E. multilocularis-Patienten vorhanden (Abb. 28, Tab. 26).

4.3.1.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei 4 Antigenen (MG 26.000 - 75.000) waren Antikörper sowohl bei E. multilocularis-Patienten als auch bei den Negativ-Kontrollen darstellbar. Antikörper gegen 7 Antigene (MG 14.500 - 175.000) konnten nur bei E. multilocularis-Patienten nachgewiesen werden, gegen 1 Antigen (MG 90.000) nur bei den Negativ-Kontrollen (5 von 8) (Abb. 29, Tab. 27).

4.3.2 Filariose-Patienten

4.3.2.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Bei diesem Antigen konnten Antikörper gegen 10 Antigene (MG 49.000 - 255.000) sowohl bei E. granulosus- als auch Filariose-Patienten nachgewiesen werden. Antikörper gegen 9 Antigene (MG 12.000 - 240.000) waren nur bei E. granulosus-Patienten, gegen 3 Antigene (MG 40.000 - 280.000) nur bei Filariose-Patienten vorhanden (Abb. 30, Tab. 28).

4.3.2.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

19 Antigene (MG 40.000 - 285.000) wurden sowohl von E. granulosus-Patienten als auch Filariose-Patienten erkannt. 7 Antigene (MG 12.500 - 36.000) kamen nur bei E. granulosus-Patienten, 4 Antigene (MG 20.000 - 35.000) nur bei Filariose-Patienten vor (Abb. 31, Tab. 29).

4.3.3 Patienten mit sonstigen Parasitosen

4.3.3.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Bei der Schistosomiasis waren Antikörper gegen 6 auch von E. granulosus-Patienten erkannte Antigene (MG 62.000 - 255.000) vorhanden. Antikörper gegen 12 Antigene (MG 12.000 - 240.000) kamen nur bei E. granulosus-Patienten vor, 1 Antigen (MG 310.000) nur bei Schistosomiasis.

Bei der Zystizerkose konnten Antikörper gegen 4 Antigene (MG 37.000 - 180.000) nachgewiesen werden, die auch von E. granulosus-Patienten erkannt wurden (Abb. 32, Tab. 30).

4.3.3.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei den Schistosomiasis- und den E. granulosus-Patienten waren Antikörper gegen 13 Antigene (MG 36.000 - 285.000) mit identischem Molekulargewicht nachzuweisen. Antikörper gegen 13 Antigene (MG 12.500 - 260.000) fanden sich nur bei E. granulosus-Patienten, 1 Antigen (MG 120.000) nur bei Schistosomiasis-Patienten.

Bei der Zystizerkose waren Antikörper gegen 7 auch von E. granulosus-Patienten erkannte Antigene (MG 46.000 - 285.000) darstellbar (Abb. 33, Tab. 31).

4.3.4 Spezifische Antigene bei E. granulosus

Unter Berücksichtigung der Kreuzreaktionen mit Filariose, Schistosomiasis, Zystizerkose und den Negativ-Kontrollen waren beim E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS Antikörper gegen 4 Antigene mit einem Molekulargewicht von 12.000, 16.500, 22.500 und 29.000 nur bei E. granulosus-Patienten vorhanden, beim E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol waren es 6 Antigene mit einem Molekulargewicht von 12.500, 13.500, 18.000, 24.000, 29.000 und 33.000.

4.4 Charakterisierung einzelner Antigene und Antigenfraktionen mittels Immunoblot

4.4.1 Antigen 4/5

4.4.1.1 Antigen 4/5 mit 1 % SDS

Im Vergleich zu E. granulosus-Antigenen mit 1 % SDS wurden 11 gemeinsame Antigene (MG 12.000 - 255.000) von E. granulosus-Patienten erkannt. Antikörper gegen 8 Antigene (MG 37.000 - 230.000) waren nur beim E. granulosus-Antigen vorhanden, gegen 2 Antigene (MG 40.000 und 165.000) nur bei AG 4/5 (Abb. 34, Tab. 32).

4.4.1.2 Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Im Vergleich zu E. granulosus-Antigenen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol konnten bei E. granulosus-Patienten Antikörper gegen 11 gemeinsame Antigene (MG 13.500 - 92.000) nachgewiesen werden. 15 Antigene (MG 12.500 - 285.000) waren nur bei E. granulosus-Antigen darstellbar. Im Vergleich zu AG 4/5 ohne Mercaptoethanol war nur 1 Antigen (MG 40.000) mit identischem Molekulargewicht vorhanden (Abb. 35, Tab. 33).

4.4.2 Immunoblots mit Anti Arc 4 Hyperimmunserum (4HI)

4.4.2.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Im Vergleich zu einem E. granulosus-Patienten-Mischserum (EGM) wurden von 4HI 10 gemeinsame Antigene (MG 12.000 - 255.000) erkannt. 6 Antigene (MG 37.000 - 240.000) konnten nur mit EGM, 2 Antigene (MG 40.000 und 165.000) nur mit 4HI nachgewiesen werden (Abb. 36, Tab. 34).

4.4.2.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Beim Vergleich von EGM und 4HI fanden sich 14 gemeinsame Antigene (MG 13.500 - 270.000); 9 Antigene (MG 12.500 - 285.000) wurden nur von EGM (einschließlich des Arc 5 assoziierten Antigens mit dem Molekulargewicht von 33.000), 4 Antigene (MG 31.000 - 170.000) nur von 4 HI erkannt (Abb. 36, Tab. 34).

4.4.2.3 Antigen 4/5 mit 1 % SDS

Im Vergleich zu EGM wurden bei 4HI 11 gemeinsame Antigene (MG 12.000 - 255.000) erkannt. Jeweils 2 Antigene (MG 96.000 und 240.000 bzw. 82.000 und 130.000) waren nur mit EGM bzw. 4HI darstellbar (Abb. 36, Tab. 34).

4.4.2.4 Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Beim Vergleich von EGM und 4HI konnten 8 gemeinsame Antigene (MG 13.500 - 67.000) nachgewiesen werden. 3 Antigene (MG 33.000 - 92.000) wurden nur von EGM, 6 Antigene (MG 46.000 - 220.000) nur von 4HI erkannt (Abb 36, Tab. 34).

4.4.2.5 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

6 gemeinsame Antigene (MG 11.500 - 180.000) waren bei EGM und 4HI nachweisbar. 2 Antigene (MG 13.000 und 270.000) wurden nur von EGM, 1 Antigen (MG 80.000) nur von 4HI erkannt (Abb. 36, Tab. 34).

4.4.2.6 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei EGM und 4HI waren 5 gemeinsame Antigene (MG 27.000 - 85.000) darstellbar. 4 Antigene (MG 32.000 - 75.000) konnten nur bei EGM, 1 Antigen (MG 36.000) nur bei 4HI nachgewiesen werden (Abb. 36, Tab. 34).

4.4.3 Immunoblots mit monoklonalen Antikörpern gegen Arc 5 Antigen (MAB 5)

4.4.3.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Im Vergleich zu EGM wurden von MAB 5 14 gemeinsame Antigene (MG 22.500 - 255.000) erkannt. 2 Antigene (MG 37.000 und 230.000) konnten nur bei EGM und weitere 2 Antigene (MG 40.000 und 92.000) nur bei MAB 5 dargestellt werden (Abb. 37, Tab. 35).

4.4.3.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

24 Antigene (MG 13.500 - 285.000) konnten sowohl bei EGM als auch MAB 5 nachgewiesen werden. Jeweils 1 Antigen (MG 12.500 bzw. 31.000) wurde nur von EGM bzw. MAB 5 erkannt (Abb. 37, Tab. 35).

4.4.3.3 Antigen 4/5 mit 1 % SDS

10 gemeinsame Antigene (MG 12.000 - 255.000) konnten bei EGM und MAB 5 nachgewiesen werden. Jeweils 2 Antigene (MG 30.000 und 115.000 bzw. 32.000 und 130.000) wurden nur von EGM bzw. MAB 5 erkannt (Abb. 37, Tab. 35).

4.4.3.4 Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Beim Vergleich von EGM und MAB 5 fanden sich Antikörper gegen 9 gemeinsame Antigene (MG 13.500 - 92.000), insbesondere gegen das Antigen mit dem Molekulargewicht von 33.000, das die stärkste Bindung von MAB 5 zeigte. 2 Antigene (MG 31.000 und 40.000) konnten nur bei EGM, 5 Antigene (MG 49.000 - 165.000) nur bei MAB 5 dargestellt werden (Abb. 37, Tab. 35.)

4.4.3.5 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

Im Vergleich zu EGM wurden von MAB 5 5 gemeinsame Antigene (MG 95.000 - 180.000) erkannt. Jeweils 3 Antigene (MG 115.000 - 270.000 bzw. 57.000 - 80.000) konnten nur bei EGM bzw. MAB 5 nachgewiesen werden (Abb. 37, Tab. 35).

4.4.3.6 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

7 Antigene (MG 43.000 - 85.000) konnten sowohl von EGM als auch MAB 5 erkannt werden. 3 Antigene (MG 24.000 - 46.000) waren nur bei MAB 5 darstellbar (Abb. 37, Tab. 35).

4.4.4 Immunoblots mit Antiseren (Human, Ziege, Schaf) gegen P₁-Antigen

4.4.4.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

Bei EGM und Anti P₁Human, Ziege, Schaf waren Antikörper gegen 10 gemeinsame Antigene (MG 37.000 - 230.000) nachzuweisen. 7 Antigene

(MG 12.000 - 255.000) waren nur bei EGM, 1 Antigen (MG 32.000) nur bei Anti P₁ Human, Ziege, Schaf darstellbar. Anti P₁ Ziege und Schaf erkannten identische Antigene (Abb. 38, Tab. 36).

4.4.4.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

15 gemeinsame Antigene (MG 13.500 - 270.000) konnten mit EGM und den Anti P₁-Seren nachgewiesen werden. 11 Antigene (MG 12.500 - 285.000), einschließlich des Arc 5 assoziierten Antigens (MG 33.000), wurden nur von EGM erkannt, 1 Antigen (MG 170.000) nur von Anti P₁-Seren. Alle Anti P₁-Seren erkannten dieselben Antigene (Abb. 38, Tab. 37).

4.5 Immunoblot mit *Onchocerca volvulus*-Antigen

4.5.1 Vergleich von Filariose-, E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten

4.5.1.1 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS

Bei den Filariose-, E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten konnten 17 gemeinsame Antigene (MG 21.500 - 315.000) nachgewiesen werden. 5 Antigene (MG 15.500 - 160.000) waren nur bei den Filariose-Patienten vorhanden. E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten zeigten identische Antigene (Tab. 39, Tab. 38).

4.5.1.2 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

23 gemeinsame Antigene (MG 21.000 - 340.000) waren bei den Filariose-, E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten darstellbar. 8 Antigene (MG 18.500 - 280.000) fanden sich nur bei den Filariose-Patienten. Auch hier zeigten E. granulosus und E. multilocularis identische Antigene (Abb. 40, Tab. 39).

Im Vergleich zum O. volvulus-Antigen ohne Mercaptoethanol (siehe 4.5.1.1) waren bei den Filariose-Patienten 8 gemeinsame Antigene (MG 31.000 - 290.000), bei den E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten 6 gemeinsame Antigene (MG 82.000 - 290.000) nachzuweisen.

4.5.2 Vergleich von Onchozerkose-, D. perstans-, Strongyloidiasis- und Ankylostomiasis-Patienten

4.5.2.1 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS

Bei Onchozerkose-, D. perstans-, Strongyloidiasis- und Ankylostomiasis-Patienten waren Antikörper gegen 5 Antigene (MG 37.000 - 180.000) bei allen Patienten vorhanden. 1 Antigen (MG 67.000) wurde nur von D. perstans-, Strongyloidiasis- und Ankylostomiasis-Patienten erkannt. Beim Vergleich mit Onchozerkose-Patienten waren bei D. perstans-Patienten Antikörper gegen 12 Antigene (MG 21.000 - 330.000), bei Strongyloidiasis-Patienten gegen 8 Antigene (MG 37.000 - 180.000), bei Ankylostomiasis-Patienten gegen 6 Antigene (MG 37.000 - 180.000) mit identischem Molekulargewicht nachzuweisen (Abb. 41, Tab. 40).

4.5.2.2 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

Bei den o.g. Patienten waren Antikörper gegen 7 gemeinsame Antigene (MG 14.000 - 270.000) darstellbar. Antikörper gegen 3 Antigene (MG 42.000 - 130.000) waren nur bei D. perstans-, Strongyloidiasis- und Ankylostomiasis-Patienten vorhanden. Beim Vergleich mit Onchozerkose-Patienten konnten bei D. perstans-Patienten 13 Antigene (MG 14.000 - 270.000), bei Strongyloidiasis-Patienten 8 Antigene (MG 14.000 - 270.000) und bei Ankylostomiasis-Patienten 12 Antigene (MG 12.500 - 310.000) mit identischem Molekulargewicht nachgewiesen werden (Abb. 42, Tab. 41).

Im Vergleich zum O. volvulus-Antigen ohne Mercaptoethanol (siehe 4.5.2.1) konnten bei Onchozerkose-Patienten Antikörper gegen 5 Antigene (MG 58.000 - 170.000), bei D. perstans-Patienten Antikörper gegen 3 Antigene (MG 21.000 - 105.000), bei Ankylostomiasis-Patienten Antikörper gegen 1 Antigen (MG 67.000) und bei Strongyloidiasis-Patienten keine Antigene mit identischem Molekulargewicht dargestellt werden.

4.5.3 Spezifische Antigene bei *O. volvulus*

Unter Berücksichtigung der Kreuzreaktionen mit *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *D. perstans*, Strongyloidiasis und Ankylostomiasis waren beim *O. volvulus*-Antigen mit 1 % SDS Antikörper gegen 3 Antigene mit einem Molekulargewicht von 19.000, 52.000 und 170.000 nur bei Onchozerkose-Patienten nachweisbar, beim *O. volvulus*-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol waren es 4 Antigene mit einem Molekulargewicht von 32.000, 160.000, 190.000 und 300.000.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vergleich von Coomassie-Blau-Färbung und Silber-Färbung in 4-30 %igem SDS-Polyacrylamidgel

4.1.1 Molekulargewichtsbestimmung

4.1.1.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

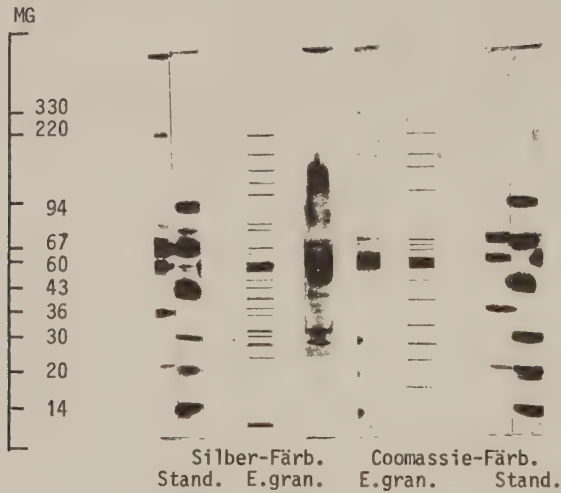


Abbildung 3

MG	
Silber	Coomassie
210.000	210.000
175.000	175.000
145.000	150.000
130.000	-
115.000	115.000
82.000	-
80.000	-
67.000	67.000
65.000	65.000
62.000	62.000
52.000	52.000
46.000	46.000
45.000	-
40.000	40.000
36.000	-
35.000	-
30.000	30.000
29.500	-
26.000	26.000
24.000	24.000
-	18.500
12.500	-

Tabelle 1

4.1.1.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

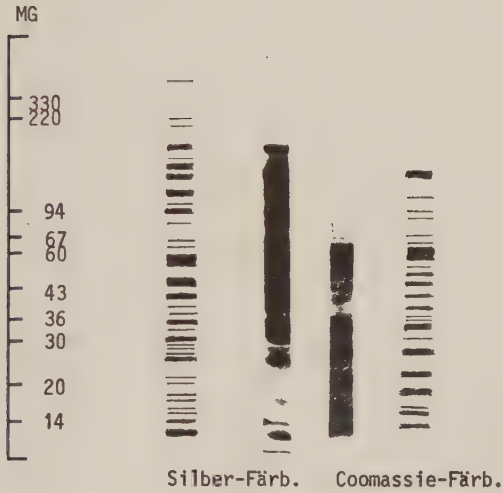


Abbildung 4

MG			
Silber	Coomassie		
310.000	-		
230.000	-		
210.000	-		
175.000	-		
150.000	-		
140.000	-		
130.000	130.000		
115.000	110.000		
100.000	-		
94.000	95.000		
85.000	85.000		
72.000	72.000		
70.000	70.000		
67.000	67.000		
-	54.000		
52.000	52.000		
43.000	43.000	Silber	Coomassie
40.000	40.000	25.000	-
38.000	38.000	22.500	22.500
35.000	35.000	19.500	-
33.000	33.000	18.000	18.000
30.000	30.000	17.000	-
29.000	29.000	16.000	-
27.500	-	15.000	15.000
26.000	26.000	14.000	14.000
		12.500	12.500

Tabelle 2

4.1.1.3 Antigen 4/5 mit 1 % SDS

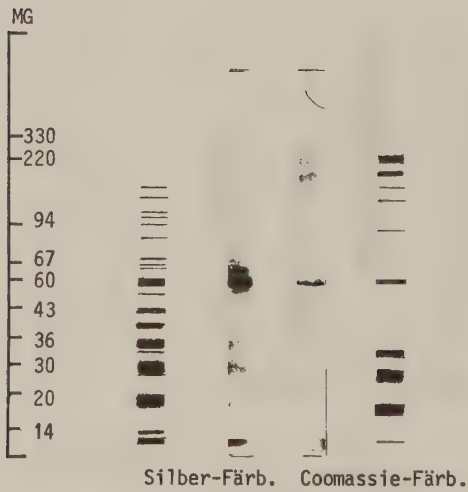


Abbildung 5

Silber	MG	Coomassie
-		180.000
-		160.000
150.000		150.000
135.000		135.000
115.000		-
110.000		-
100.000		100.000
90.000		-
72.000		-
67.000		-
65.000		-
58.000		58.000
50.000		-
42.000		-
37.000		-
31.000		-
29.500		29.000
25.000		24.500
19.000		18.000
14.500		-
13.500		13.500

Tabelle 3

4.1.1.4 Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

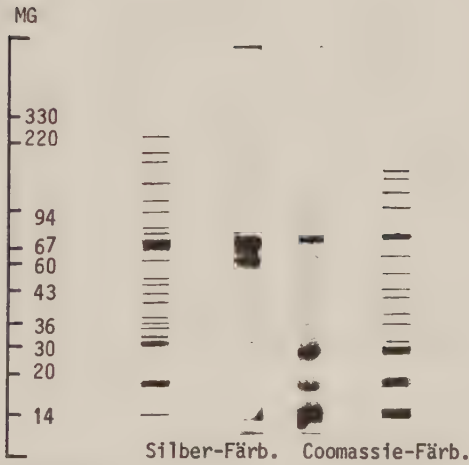


Abbildung 6

	MG	
Silber		Coomassie
210.000		-
170.000		-
150.000		-
-		140.000
125.000		120.000
105.000		110.000
90.000		90.000
80.000		-
72.000		-
65.000		65.000
58.000		58.000
46.000		46.000
44.000		-
40.000		40.000
37.000		37.000
33.000		33.000
31.000		-
30.000		30.000
27.500		-
25.500		25.500
-		22.500
18.000		18.000
14.000		14.000

4.1.1.5 *E. multilocularis*-Antigen mit 1 % SDS

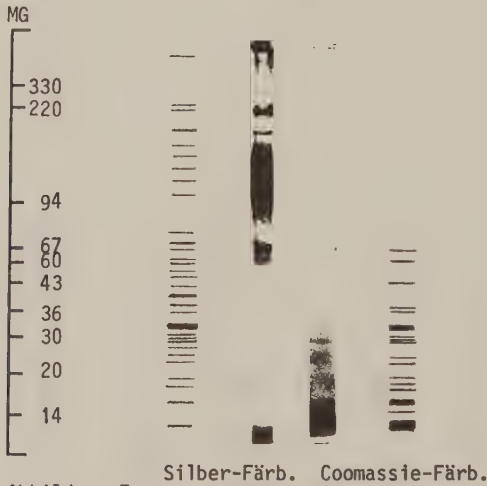


Abbildung 7

MG			
Silber	Coomassie		
350.000	-		
220.000	-		
210.000	-		
180.000	-		
150.000	-		
135.000	-		
125.000	-		
105.000	-		
97.000	-		
70.000	-		
67.000	67.000		
60.000	-		
55.000	55.000		
53.000	-		
48.000	-		
45.000	45.000		
40.000	-		
38.000	-		
35.000	35.000	Silber	Coomassie
33.000	33.000	21.000	21.000
29.000	29.000	-	18.500
27.500	27.500	17.000	17.000
26.000	26.000	16.000	16.000
25.500	25.500	14.500	14.500
24.500	-	-	13.500
22.500	22.500	11.500	11.500

Tabelle 5

4.1.1.6 *E. multilocularis*-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

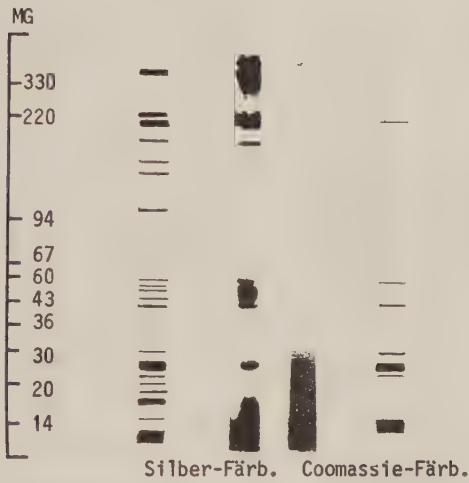


Abbildung 8

	MG	
Silber		Coomassie
350.000		-
220.000		220.000
210.000		-
180.000		-
150.000		-
135.000		-
97.000		-
53.000		53.000
50.000		-
47.000		-
44.000		-
40.000		40.000
27.500		27.500
24.000		24.000
20.000		20.000
18.500		-
18.000		-
17.000		-
14.500		14.500
12.500		-

Tabelle 6

4.1.2 Vergleich von *E. granulosus*-Antigen verschiedener Herkunft in 4-30%igem Polyacrylamidgel (*E. granulosus*-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol)

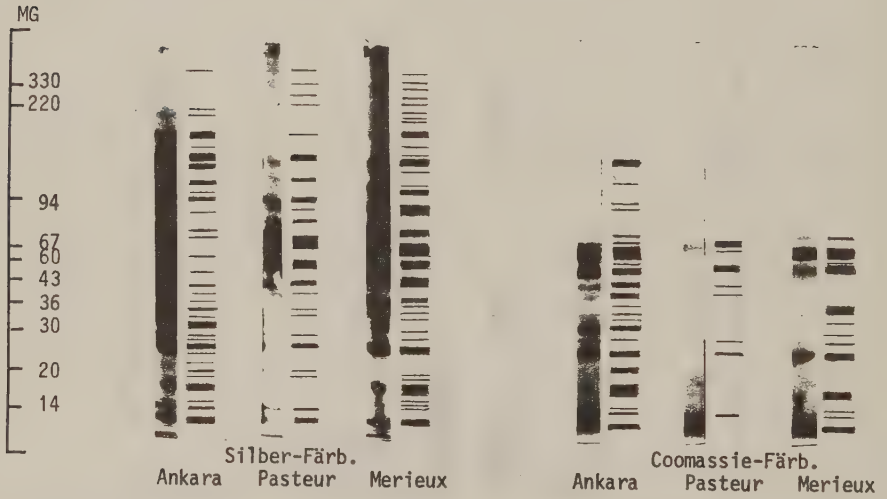


Abbildung 9

MG

Silber-Färb.			Coomassie-Färb.		
Ankara	Pasteur	Merieux	Ankara	Pasteur	Merieux
310.000	310.000	310.000	-	-	-
-	-	290.000	-	-	-
-	270.000	270.000	-	-	-
-	245.000	245.000	-	-	-
230.000	230.000	230.000	-	-	-
210.000	-	210.000	-	-	-
-	-	205.000	-	-	-
-	-	200.000	-	-	-
175.000	175.000	175.000	-	-	-
150.000	-	150.000	-	-	-
140.000	140.000	140.000	-	-	-
130.000	-	130.000	130.000	-	-
-	-	125.000	-	-	-
115.000	115.000	110.000	110.000	-	-
100.000	-	100.000	-	-	-
94.000	94.000	-	95.000	-	-
85.000	90.000	90.000	85.000	-	-
-	78.000	-	-	-	-
72.000	-	72.000	72.000	-	72.000
70.000	70.000	-	70.000	70.000	-
67.000	-	67.000	67.000	67.000	67.000
-	54.000	54.000	54.000	-	54.000
52.000	-	-	52.000	52.000	52.000
43.000	43.000	43.000	43.000	43.000	-
40.000	40.000	-	40.000	40.000	-
38.000	-	38.000	38.000	-	38.000
35.000	35.000	35.000	35.000	-	-
33.000	33.000	33.000	33.000	-	33.000
30.000	-	30.000	30.000	-	30.000
29.000	29.000	29.000	29.000	29.000	29.000
27.500	-	27.500	-	-	-
26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000
25.000	-	-	-	-	-
22.500	-	-	22.500	-	-
19.500	19.500	19.500	-	-	-
18.000	18.000	18.000	18.000	-	18.000
17.000	-	17.000	-	-	-
15.000	-	15.000	15.000	-	15.000
-	-	14.500	-	-	-
14.000	14.000	14.000	14.000	14.000	14.000
12.500	12.500	12.500	12.500	-	12.500

Tabelle 7

4.1.3 Vergleich von *E. granulosus*- und *E. multilocularis*-Antigenen in 4-30%igem Polyacrylamidgel in der Silber-Färbung

4.1.3.1 Antigene mit 1 % SDS

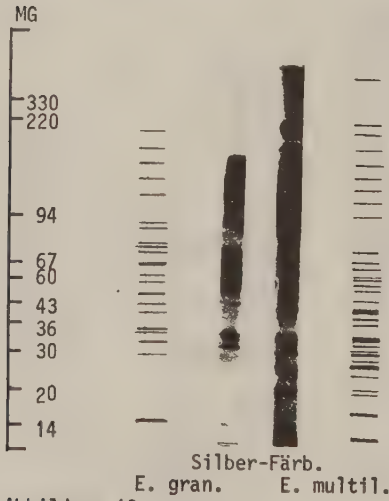


Abbildung 10

MG			
E.gran.	E. multil.		
-	350.000		
-	220.000		
210.000	210.000		
175.000	180.000		
145.000	150.000		
130.000	135.000		
115.000	125.000		
-	105.000		
-	97.000		
82.000	-		
80.000	-		
67.000	70.000		
65.000	67.000		
62.000	60.000		
-	55.000		
52.000	53.000		
46.000	48.000		
45.000	45.000		
40.000	40.000	E.gran.	E.multil.
36.000	38.000	-	25.500
35.000	35.000	24.000	24.500
-	33.000	-	22.500
30.000	-	-	21.000
29.500	29.000	-	17.000
-	27.500	-	16.000
26.000	26.000	-	14.500
		12.500	11.500

Tabelle 8

4.1.3.2 Antigene mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

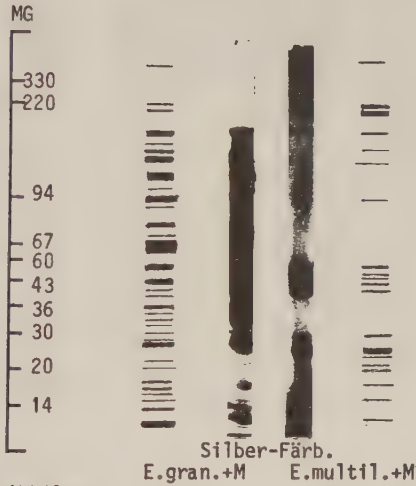


Abbildung 11

MG	
E.gran.+M	E.multil.+M
-	350.000
310.000	-
230.000	220.000
210.000	210.000
175.000	180.000
150.000	150.000
140.000	-
130.000	135.000
115.000	-
100.000	-
94.000	97.000
85.000	-
72.000	-
70.000	-
67.000	-
52.000	53.000
-	50.000
-	47.000
43.000	44.000
40.000	40.000
38.000	-
35.000	-
33.000	-
30.000	-
29.000	-
27.500	27.500

E.gran.+M	E.multil.+M
26.000	-
25.000	24.000
22.500	-
-	20.000
19.500	18.500
18.000	18.000
17.000	17.000
16.000	-
15.000	14.500
14.000	-
12.500	12.500

4.2 Immunoblot mit homologen Seren

4.2.1 E. granulosus-Patienten

4.2.1.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

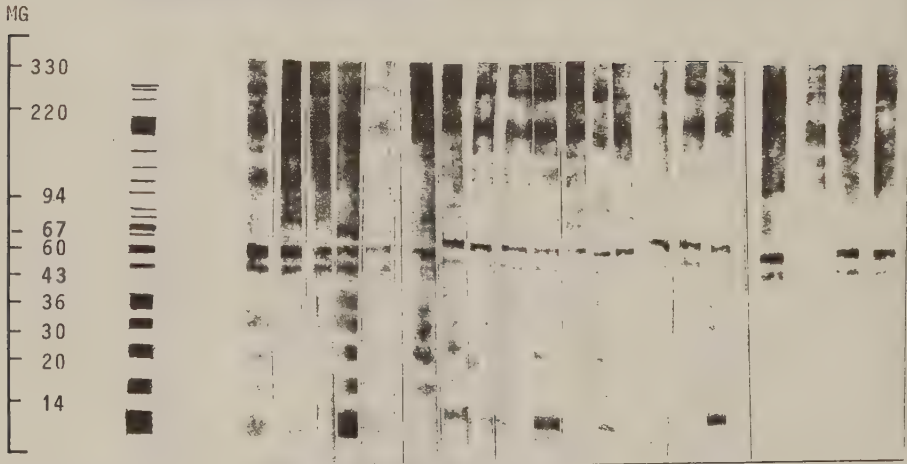


Abbildung 12

MG	
255.000	alle Pat.
240.000	alle Pat.
230.000	alle Pat.
180.000	alle Pat.
150.000	alle Pat.
115.000	alle Pat.
105.000	alle Pat.
96.000	13 Pat.
90.000	12 Pat.
82.000	12 Pat.
77.000	1 Pat.
67.000	1 Pat.
62.000	alle Pat.
49.000	alle Pat.
37.000	15 Pat.
29.000	15 Pat.
22.500	15 Pat.
16.500	15 Pat.
12.000	15 Pat.

Tabelle 10

4.2.1.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

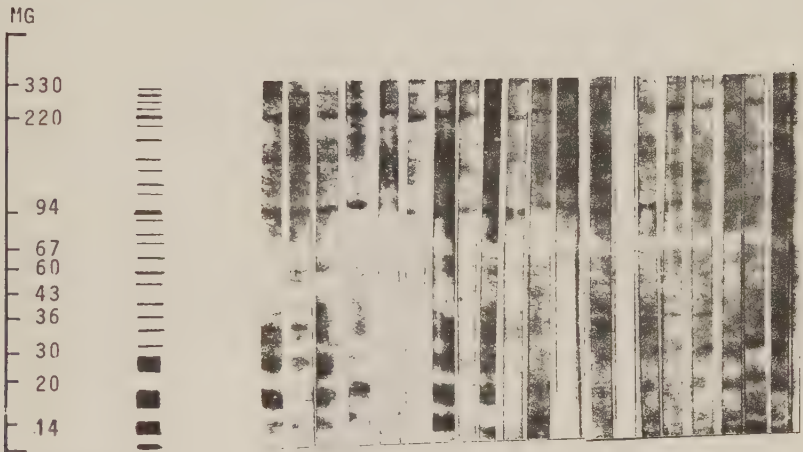
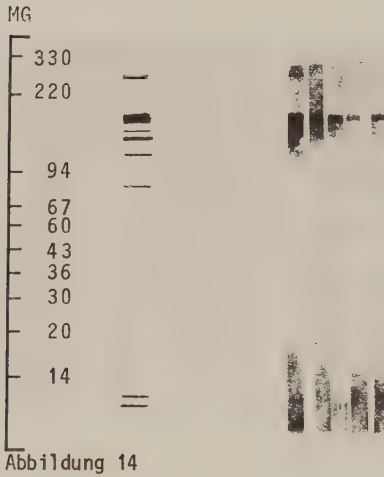


Abbildung 13

MG	
285.000	9 Pat.
270.000	alle Pat.
260.000	14 Pat.
240.000	16 Pat.
220.000	alle Pat.
185.000	16 Pat.
160.000	alle Pat.
140.000	alle Pat.
125.000	alle Pat.
115.000	alle Pat.
105.000	18 Pat.
92.000	alle Pat.
80.000	6 Pat.
72.000	18 Pat.
67.000	17 Pat.
57.000	alle Pat.
52.000	alle Pat.
46.000	18 Pat.
40.000	18 Pat.
36.000	17 Pat.
33.000	17 Pat.
29.000	17 Pat.
24.000	18 Pat.
18.000	18 Pat.
13.500	16 Pat.
12.500	7 Pat.

Tabelle 11

4.2.1.3 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS



MG	
270.000	1 Pat.
180.000	alle Pat.
170.000	alle Pat.
150.000	alle Pat.
125.000	1 Pat.
95.000	alle Pat.
13.000	2 Pat.
11.500	alle Pat.

Tabelle 12

4.2.1.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

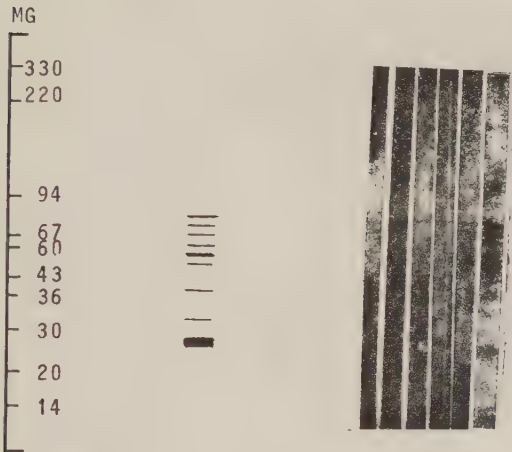


Abbildung 15

MG	
85.000	alle Pat.
75.000	alle Pat.
70.000	alle Pat.
62.000	1 Pat.
57.000	alle Pat.
52.000	2 Pat.
43.000	1 Pat.
32.000	1 Pat.
27.000	1 Pat.

Tabelle 13

4.2.2 E. multilocularis-Patienten

4.2.2.1 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

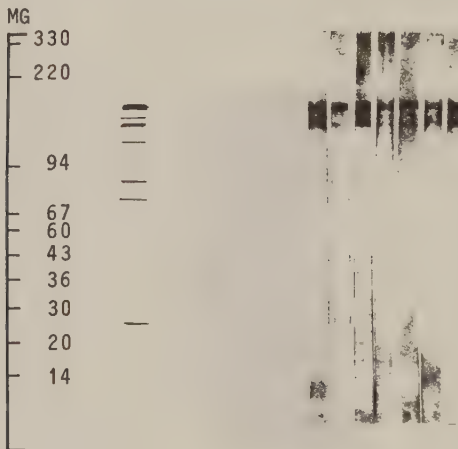


Abbildung 16

MG	
170.000	alle Pat.
150.000	alle Pat.
140.000	alle Pat.
115.000	1 Pat.
85.000	6 Pat.
75.000	4 Pat.
24.500	1 Pat.

Tabelle 14

4.2.2.2 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

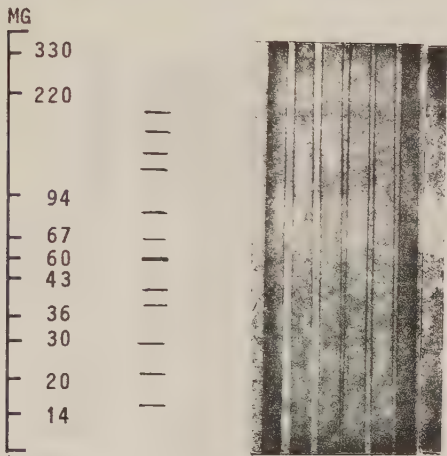


Abbildung 17

MG	
175.000	2 Pat.
150.000	1 Pat.
135.000	1 Pat.
110.000	1 Pat.
75.000	alle Pat.
65.000	1 Pat.
52.000	alle Pat.
37.000	4 Pat.
33.000	alle Pat.
26.000	alle Pat.
19.500	2 Pat.
14.500	4 Pat.

Tabelle 15

4.2.2.3 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

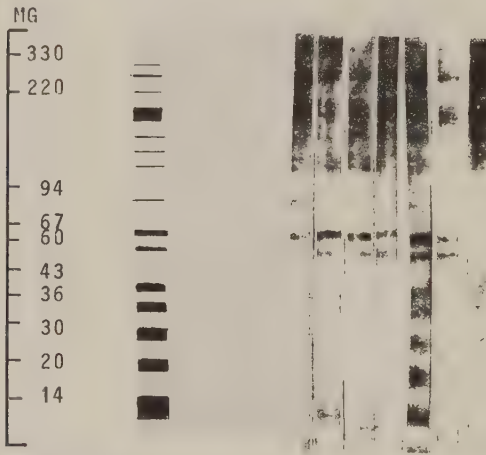


Abbildung 18

MG	
260.000	alle Pat.
235.000	alle Pat.
200.000	2 Pat.
175.000	alle Pat.
140.000	alle Pat.
115.000	alle Pat.
105.000	alle Pat.
80.000	2 Pat.
62.000	alle Pat.
48.000	alle Pat.
36.000	4 Pat.
28.000	3 Pat.
22.500	3 Pat.
16.500	3 Pat.
12.000	3 Pat.

Tabelle 16

4.2.2.4 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

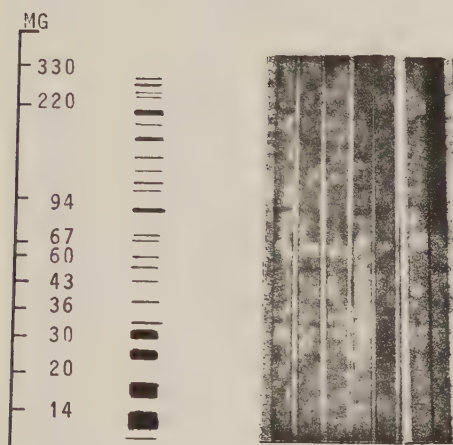


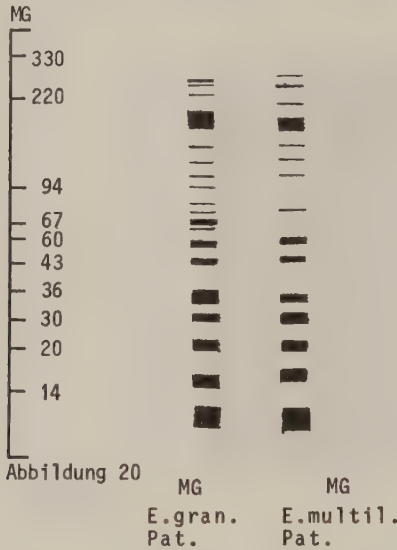
Abbildung 19

MG	
280.000	4 Pat.
270.000	alle Pat.
245.000	alle Pat.
235.000	5 Pat.
210.000	alle Pat.
190.000	alle Pat.
160.000	alle Pat.
140.000	alle Pat.
125.000	alle Pat.
115.000	alle Pat.
105.000	alle Pat.
85.000	alle Pat.
70.000	5 Pat.
68.000	4 Pat.
58.000	alle Pat.
52.000	alle Pat.
46.000	6 Pat.
40.000	4 Pat.
33.000	alle Pat.
29.000	4 Pat.
24.500	6 Pat.
18.500	4 Pat.
13.000	4 Pat.
12.000	2 Pat.

Tabelle 17

4.2.3 Kreuzreaktionen bei E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten im Immunoblot

4.2.3.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS



	MG	MG	
	E.gran. Pat.	E.multil. Pat.	
alle Pat.	255.000	260.000	alle Pat.
alle Pat.	240.000	235.000	alle Pat.
alle Pat.	230.000	-	-
-	-	200.000	2 Pat.
alle Pat.	180.000	175.000	alle Pat.
alle Pat.	150.000	140.000	alle Pat.
alle Pat.	115.000	115.000	alle Pat.
alle Pat.	105.000	105.000	alle Pat.
13 Pat.	96.000	-	-
12 Pat.	90.000	-	-
12 Pat.	82.000	80.000	2 Pat.
1 Pat.	77.000	-	-
1 Pat.	67.000	-	-
alle Pat.	62.000	62.000	alle Pat.
alle Pat.	49.000	48.000	alle Pat.
15 Pat.	37.000	36.000	4 Pat.
15 Pat.	29.000	28.000	3 Pat.
15 Pat.	22.500	22.500	3 Pat.
15 Pat.	16.500	16.500	3 Pat.
15 Pat.	12.000	12.000	3 Pat.

Tabelle 18

4.2.3.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

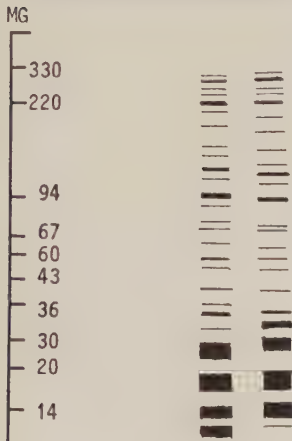
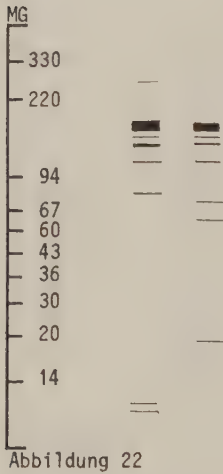


Abbildung 21

	MG E.gran. Pat.	MG E.multil. Pat.	
9 Pat.	285.000	280.000	4 Pat.
alle Pat.	270.000	270.000	alle Pat.
14 Pat.	260.000	245.000	alle Pat.
16 Pat.	240.000	235.000	5 Pat.
alle Pat.	210.000	210.000	alle Pat.
16 Pat.	185.000	190.000	alle Pat.
alle Pat.	160.000	160.000	alle Pat.
Alle Pat.	140.000	140.000	alle Pat.
alle Pat.	125.000	125.000	alle Pat.
alle Pat.	115.000	115.000	alle Pat.
18 Pat.	105.000	105.000	alle Pat.
alle Pat.	92.000	85.000	alle Pat.
6 Pat.	80.000	-	-
18 Pat.	72.000	70.000	5 Pat.
17 Pat.	67.000	68.000	4 Pat.
alle Pat.	57.000	58.000	alle Pat.
alle Pat.	52.000	52.000	alle Pat.
18 Pat.	46.000	46.000	6 Pat.
18 Pat.	40.000	40.000	4 Pat.
17 Pat.	36.000	-	-
17 Pat.	33.000	33.000	alle Pat.
17 Pat.	29.000	29.000	4 Pat.
18 Pat.	24.000	24.500	6 Pat.
18 Pat.	18.000	18.500	4 Pat.
16 Pat.	13.500	13.000	4 Pat.
7 Pat.	12.500	12.000	2 Pat.

Tabelle 19

4.2.3.3 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS



	MG	MG	
	E.gran.	E.multil.	
	Pat.	Pat.	
1 Pat.	270.000	-	-
alle Pat.	180.000	170.000	alle Pat.
alle Pat.	170.000	150.000	alle Pat.
alle Pat.	140.000	140.000	alle Pat.
1 Pat.	125.000	115.000	1 Pat.
alle Pat.	95.000	-	-
-	-	85.000	6 Pat.
-	-	75.000	4 Pat.
-	-	24.500	1 Pat.
2 Pat.	13.000	-	-
alle Pat.	11.500	-	-

Tabelle 20

4.2.3.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

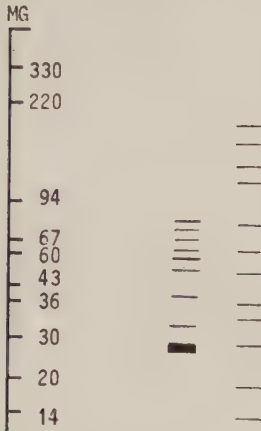


Abbildung 23

	MG	MG	
	E.gran. Pat.	E.multil. Pat.	
-	-	175.000	2 Pat.
-	-	150.000	1 Pat.
-	-	135.000	1 Pat.
-	-	110.000	1 Pat.
alle Pat.	85.000	-	-
alle Pat.	75.000	75.000	alle Pat.
alle Pat.	70.000	-	-
1 Pat.	62.000	65.000	1 Pat.
alle Pat.	57.000	-	-
2 Pat.	52.000	52.000	alle Pat.
1 Pat.	43.000	-	-
-	-	37.000	4 Pat.
1 Pat.	32.000	33.000	alle Pat.
1 Pat.	27.000	26.000	alle Pat.
-	-	19.500	2 Pat.
-	-	14.500	4 Pat.

Tabelle 21

4.2.4 Zuordnung der Proteine im 4-30%igen Polyacrylamidgel (Coomassie-Blau-, Silber-Färbung) zu im Immunoblot erkannten Antigenen

4.2.4.1 *E. granulosus*-Antigen mit 1 % SDS

4.2.4.2 *E. multilocularis*-Antigen mit 1 % SDS

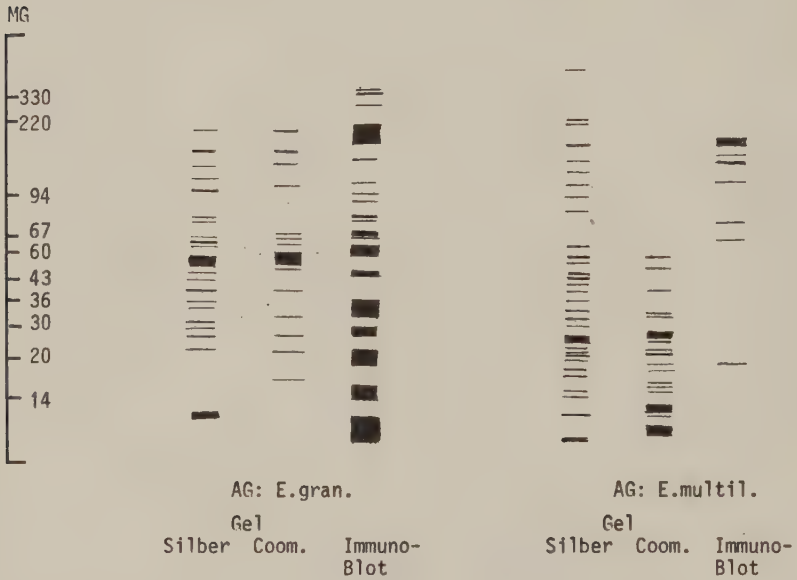


Abbildung 24

AG: E. gran.			AG: E. multil.		
Silber-F.	Coomassie-F.	Immuno-	Silber-F.	Coomassie-F.	Immuno-
Ge1		Blot	Ge1		Blot
-	-	-	350.000	-	-
-	-	255.000	-	-	-
-	-	240.000	-	-	-
-	-	230.000	-	-	-
-	-	-	220.000	-	-
210.000	210.000	-	210.000	-	-
175.000	175.000	180.000	180.000	-	170.000
145.000	150.000	150.000	150.000	-	150.000
130.000	-	-	135.000	-	140.000
115.000	115.000	115.000	125.000	-	115.000
-	-	105.000	105.000	-	-
-	-	96.000	97.000	-	-
-	-	90.000	-	-	85.000
82.000	-	82.000	-	-	-
80.000	-	-	-	-	-
-	-	77.000	-	-	-
-	-	-	70.000	-	75.000
67.000	67.000	67.000	67.000	67.000	-
65.000	65.000	-	-	-	-
62.000	62.000	62.000	60.000	-	-
-	-	-	55.000	55.000	-
52.000	52.000	-	53.000	-	-
46.000	46.000	49.000	48.000	-	-
45.000	-	-	45.000	45.000	-
40.000	40.000	-	40.000	-	-
36.000	-	37.000	38.000	-	-
35.000	-	-	35.000	35.000	-
-	-	-	33.000	33.000	-
30.000	30.000	-	-	-	-
29.500	-	29.000	29.000	29.000	-
-	-	-	27.500	27.500	-
26.000	26.000	-	26.000	26.000	-
-	-	-	25.500	25.500	-
24.000	24.000	-	24.500	-	24.500
-	-	22.500	22.500	22.500	-
-	-	-	21.000	21.000	-
-	18.500	-	-	18.500	-
-	-	-	17.000	17.000	-
-	-	16.500	16.000	16.000	-
-	-	-	14.500	14.500	-
-	-	-	-	13.500	-
12.500	-	12.000	-	-	-
-	-	-	11.000	11.500	-

Tabelle 22

4.2.4.3 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

4.2.4.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol



Abbildung 25

AG: E.gran. + M.			AG: E.multil. + M.		
Silber-F.	Coomassie-F.	Immuno- Blot	Silber-F.	Coomassie-F.	Immuno- Blot
Gel					
-	-	-	350.000	-	-
310.000	-	-	-	-	-
-	-	285.000	-	-	-
-	-	270.000	-	-	-
-	-	260.000	-	-	-
-	-	240.000	-	-	-
230.000	-	220.000	220.000	220.000	-
210.000	-	-	210.000	-	-
-	-	185.000	-	-	-
175.000	-	160.000	180.000	-	175.000
150.000	-	-	150.000	-	150.000
140.000	-	140.000	-	-	-
130.000	130.000	125.000	135.000	-	135.000
115.000	110.000	115.000	-	-	110.000
100.000	-	105.000	-	-	-
94.000	95.000	92.000	97.000	-	-
85.000	85.000	80.000	-	-	-
72.000	72.000	72.000	-	-	75.000
70.000	70.000	-	-	-	-
67.000	67.000	67.000	-	-	65.000
-	54.000	57.000	-	-	-
52.000	52.000	52.000	53.000	53.000	52.000
-	-	-	50.000	-	-
-	-	-	47.000	-	-
43.000	43.000	46.000	44.000	-	-
40.000	40.000	40.000	40.000	40.000	-
38.000	38.000	-	-	-	37.000
35.000	35.000	36.000	-	-	-
33.000	33.000	33.000	-	-	33.000
30.000	30.000	-	-	-	-
29.000	29.000	29.000	-	-	-
27.500	-	-	27.500	27.500	-
26.000	26.000	-	-	-	-
25.000	-	-	24.000	24.000	26.000
22.500	22.500	24.000	-	-	-
-	-	-	20.000	20.000	-
19.500	-	-	18.500	-	19.500
18.000	18.000	18.000	18.000	-	-
17.000	-	-	17.000	-	-
16.000	-	-	-	-	-
15.000	15.000	-	14.500	14.500	14.500
14.000	14.000	13.500	-	-	-
12.500	12.500	12.500	12.500	-	-

Tabelle 23

4.3 Immoblot mit heterologen Seren

4.3.1 Negativ-Kontrollen

4.3.1.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

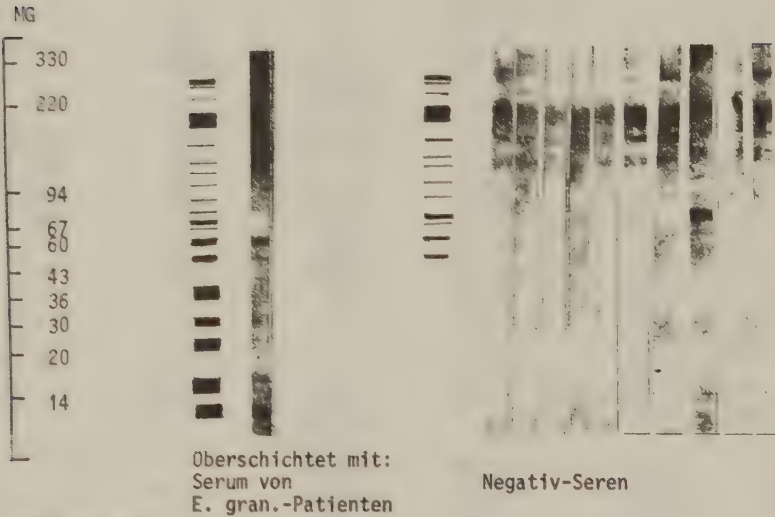


Abbildung 26

	MG	E.gran.-Seren	Negativ-Seren	
alle Pat.	255.000	255.000	255.000	8 Pat.
alle Pat.	240.000	240.000	240.000	8 Pat.
alle Pat.	230.000	230.000	230.000	8 Pat.
alle Pat.	180.000	180.000	180.000	alle Pat.
alle Pat.	150.000	150.000	150.000	alle Pat.
alle Pat.	115.000	115.000	115.000	alle Pat.
alle Pat.	105.000	105.000	105.000	alle Pat.
13 Pat.	96.000	-	-	-
12 Pat.	90.000	90.000	90.000	5 Pat.
12 Pat.	82.000	82.000	82.000	5 Pat.
1 Pat.	77.000	77.000	77.000	1 Pat.
1 Pat.	67.000	67.000	67.000	1 Pat.
alle Pat.	62.000	62.000	62.000	5 Pat.
alle Pat.	49.000	49.000	49.000	5 Pat.
15 Pat.	37.000	-	-	-
15 Pat.	29.000	-	-	-
15 Pat.	22.500	-	-	-
15 Pat.	16.500	-	-	-
15 Pat.	12.000	-	-	-

Tabelle 24

4.3.1.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

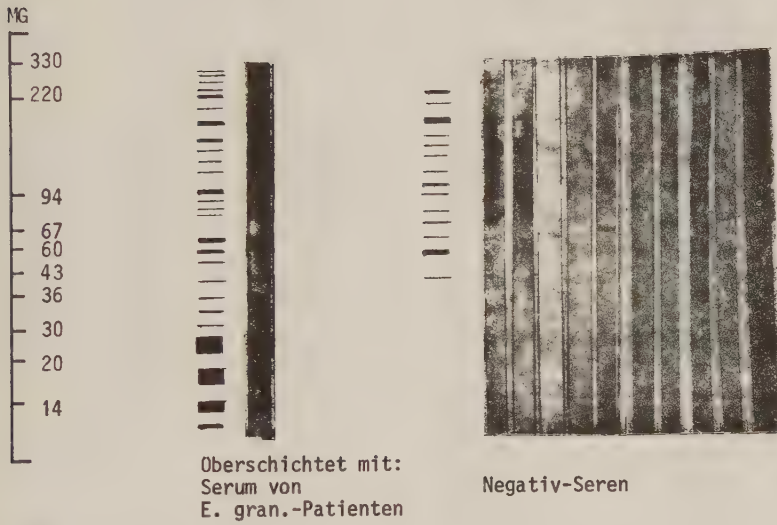


Abbildung 27

		MG	
		E.gran.-Seren	Negativ-Seren
9 Pat.	285.000	-	-
alle Pat.	270.000	-	-
14 Pat.	260.000	-	-
16 Pat.	240.000	-	-
alle Pat.	220.000	220.000	6 Pat.
16 Pat.	185.000	185.000	5 Pat.
alle Pat.	160.000	160.000	8 Pat.
alle Pat.	140.000	140.000	8 Pat.
alle Pat.	125.000	125.000	10 Pat.
alle Pat.	115.000	115.000	10 Pat.
18 Pat.	105.000	105.000	9 Pat.
alle Pat.	92.000	92.000	8 Pat.
6 Pat.	80.000	80.000	8 Pat.
18 Pat.	72.000	-	-
17 Pat.	67.000	67.000	6 Pat.
-	-	60.000	6 Pat.
alle Pat.	57.000	57.000	6 Pat.
alle Pat.	52.000	52.000	8 Pat.
18 Pat.	46.000	-	-
18 Pat.	40.000	40.000	7 Pat.
17 Pat.	36.000	-	-
17 Pat.	33.000	-	-
17 Pat.	29.000	-	-
18 Pat.	24.000	-	-
18 Pat.	18.000	-	-
16 Pat.	13.500	-	-
7 Pat.	12.500	-	-

Tabelle 25

4.3.1.3 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS

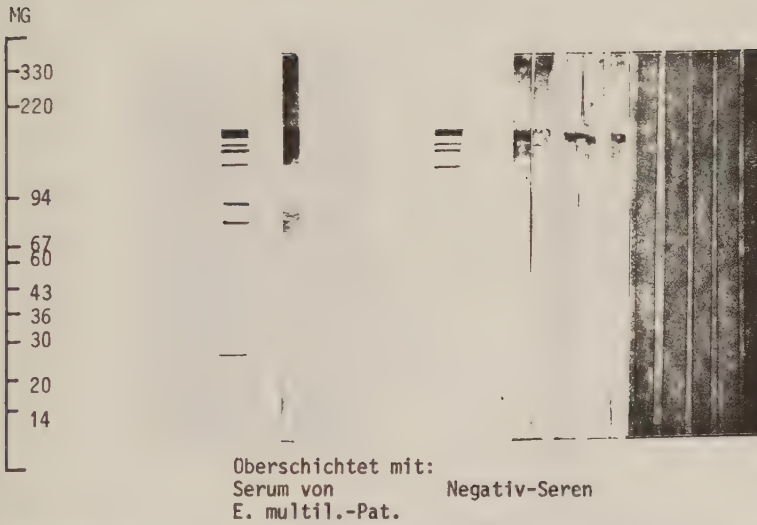


Abbildung 28

	MG		
	E.multil.-Seren	Negativ-Seren	
alle Pat.	170.000	170.000	9 Pat.
alle Pat.	150.000	150.000	9 Pat.
alle Pat.	140.000	140.000	9 Pat.
1 Pat.	115.000	115.000	3 Pat.
6 Pat.	85.000	-	-
4 Pat.	75.000	-	-
1 Pat.	24.500	-	-

Tabelle 26

4.3.1.4 E. multilocularis-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

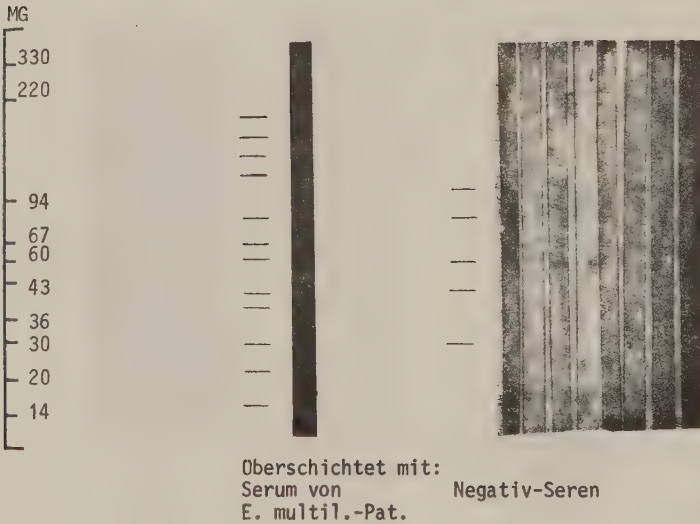


Abbildung 29

	MG		
	E.multil.-Seren	Negativ Seren	
2 Pat.	175.000	-	-
1 Pat.	150.000	-	-
1 Pat.	135.000	-	-
1 Pat.	110.000	-	-
-	-	90.000	5 Pat.
alle Pat.	75.000	75.000	3 Pat.
1 Pat.	65.000	-	-
alle Pat.	52.000	52.000	5 Pat.
4 Pat.	37.000	37.000	3 Pat.
alle Pat.	33.000	-	-
alle Pat.	26.000	26.000	3 Pat.
2 Pat.	19.500	-	-
4 Pat.	14.500	-	-

Tabelle 27

4.3.2 Filariose-Patienten

4.3.2.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

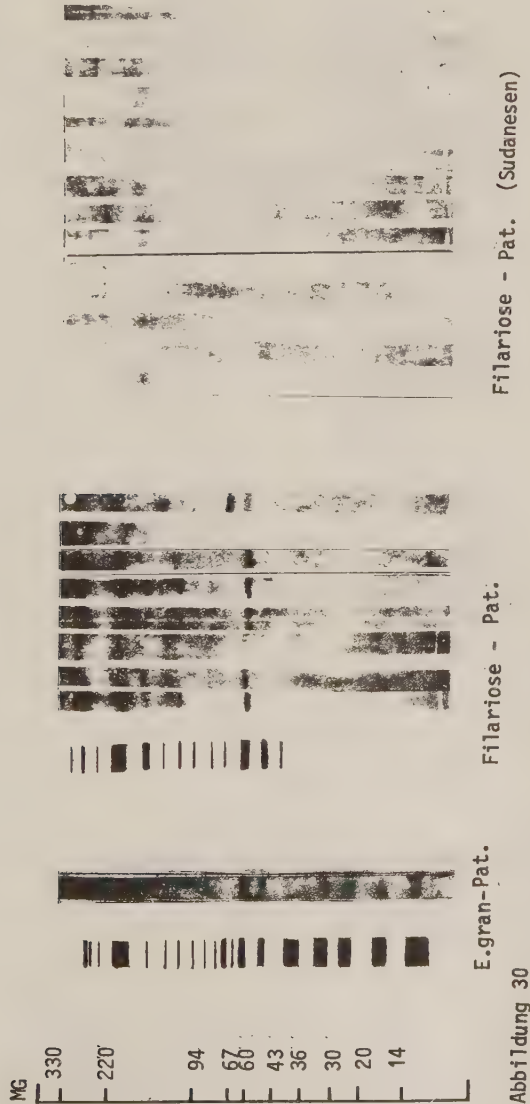


Abbildung 30

MG

E.gran.-Pat.	Filariose-Pat.
-	280.000
255.000	255.000
240.000	-
230.000	230.000
180.000	180.000
150.000	150.000
115.000	115.000
105.000	105.000
96.000	96.000
90.000	-
-	85.000
82.000	-
77.000	77.000
67.000	-
62.000	62.000
49.000	49.000
-	40.000
37.000	-
29.000	-
22.500	-
16.500	-
12.000	-

Tabelle 28

4.3.2.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

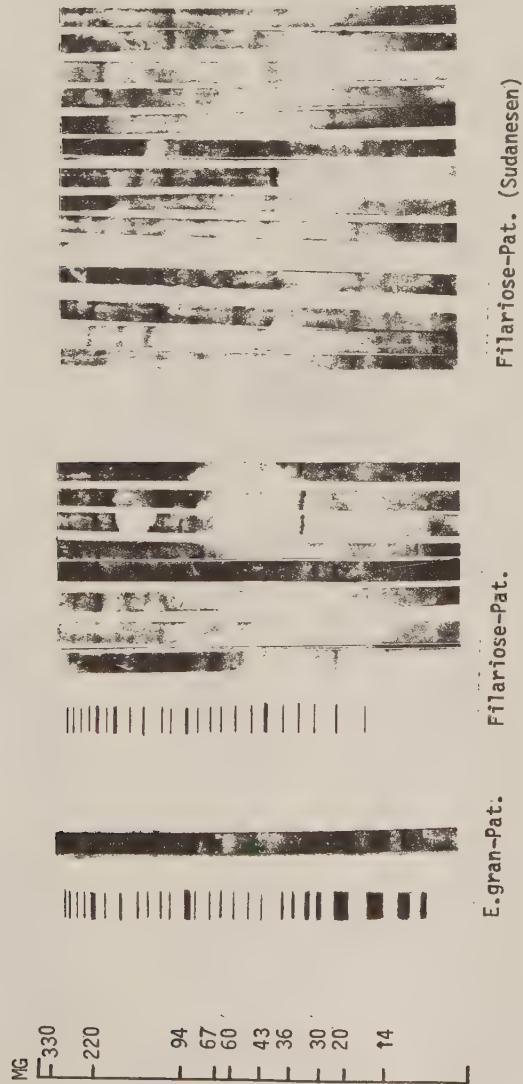


Abbildung 31

MG

E.gran.-Pat. Filariose-Pat.

285.000	285.000
270.000	270.000
260.000	260.000
240.000	240.000
220.000	220.000
185.000	185.000
160.000	160.000
140.000	140.000
125.000	125.000
115.000	115.000
105.000	105.000
92.000	92.000
80.000	80.000
72.000	72.000
67.000	67.000
57.000	57.000
52.000	52.000
46.000	46.000
40.000	40.000
36.000	-
-	35.000
33.000	-
-	31.000
29.000	-
-	26.000
24.000	-
-	20.000
18.000	-
13.500	-
12.500	-

Tabellle 29

4.3.3 Patienten mit sonstigen Parasitosen

4.3.3.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

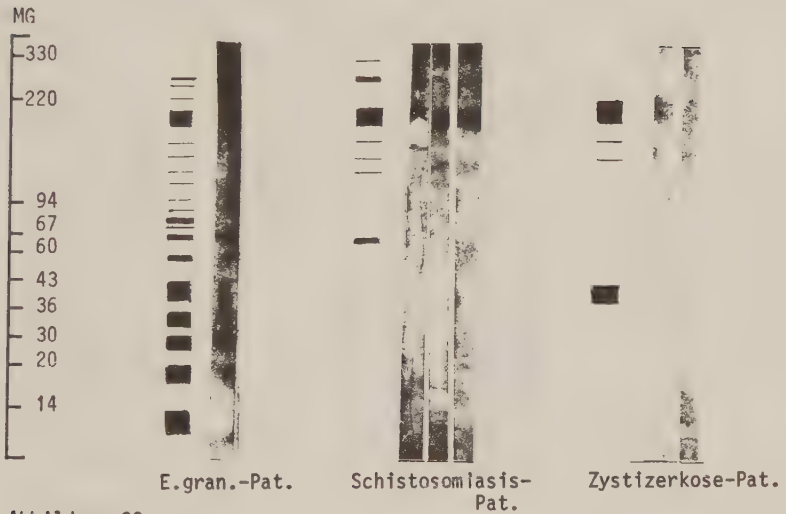


Abbildung 32

E.gran.-Pat.	Schistosomiasis-Pat.	Zystizerkose-Pat.
-	310.000	-
255.000	255.000	-
240.000	-	-
230.000	-	-
180.000	180.000	180.000
150.000	150.000	150.000
115.000	115.000	115.000
105.000	105.000	-
96.000	-	-
90.000	-	-
82.000	-	-
77.000	-	-
67.000	-	-
62.000	62.000	-
49.000	-	-
37.000	-	37.000
29.000	-	-
22.500	-	-
16.500	-	-
12.000	-	-

Tabelle 30

4.3.3.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

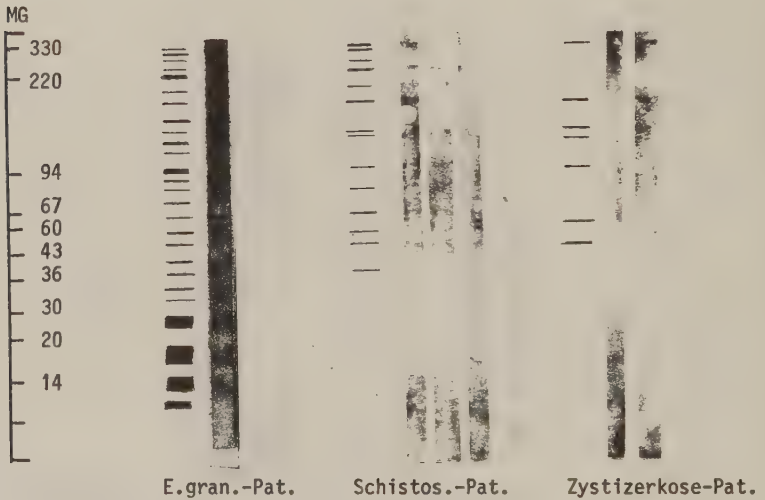


Abbildung 33

E.gran.-Pat.	Schistosomiasis-Pat.	Zystizerkose-Pat.
285.000	285.000	285.000
270.000	270.000	-
260.000	-	-
240.000	240.000	-
220.000	220.000	-
185.000	185.000	-
160.000	160.000	160.000
140.000	-	-
125.000	125.000	125.000
-	120.000	-
115.000	-	115.000
105.000	-	-
92.000	92.000	92.000
80.000	-	-
72.000	72.000	-
67.000	-	-
57.000	57.000	-
52.000	52.000	52.000
46.000	46.000	46.000
40.000	-	-
36.000	36.000	-
33.000	-	-
29.000	-	-
24.000	-	-
18.000	-	-
13.500	-	-
12.500	-	-

4.4 Charakterisierung einzelner Antigene und Antigenfraktionen mittels Immunoblot

4.4.1 Antigen 4/5

4.4.1.1 Antigen 4/5 mit 1 % SDS



Abbildung 34

AG: E.gran. Serum von E.gran.Pat.	AG 4/5 Serum von E.gran.Pat.	AG 4/5 Serum von E.multil. Pat.	AG 4/5 Negativ- Kontrolle
255.000	255.000	255.000	-
240.000	240.000	240.000	-
230.000	-	-	-
180.000	-	-	-
-	165.000	165.000	-
150.000	-	-	-
115.000	115.000	115.000	-
105.000	105.000	105.000	-
96.000	96.000	96.000	-
90.000	-	-	-
82.000	-	-	-
77.000	-	-	-
67.000	-	-	-
62.000	62.000	62.000	62.000
49.000	49.000	49.000	49.000
-	-	-	46.000
-	40.000	40.000	-
37.000	-	-	-
29.000	30.000	30.000	-
22.500	24.000	24.000	-
16.500	17.000	17.000	17.000
12.000	12.000	12.000	-

Tabelle 32

4.4.1.2 Antigen 4/5 mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

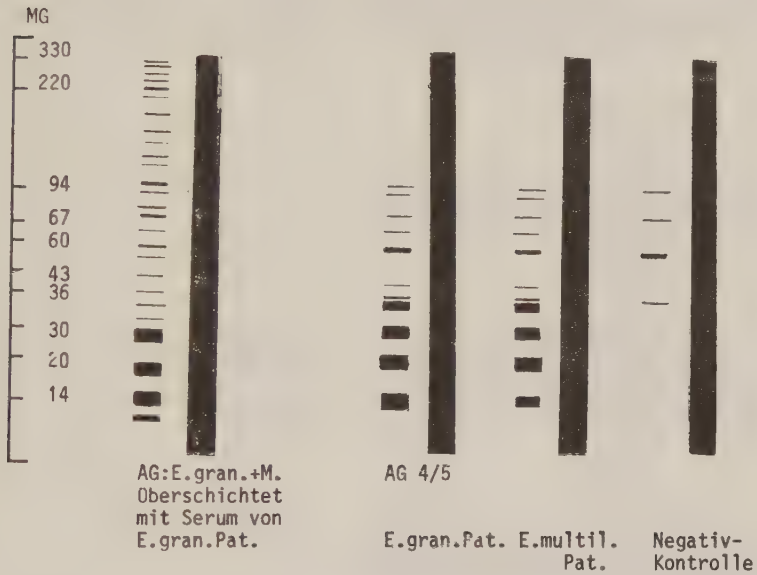


Abbildung 35

AG: E.gran.+M Serum von E.gran.Pat.	AG 4/5 + M Serum von E.gran.Pat.	AG 4/5 + M Serum von E.multil.Pat.	AG 4/5 + M Negativ- Kontrolle
285.000	-	-	-
270.000	-	-	-
260.000	-	-	-
240.000	-	-	-
220.000	-	-	-
185.000	-	-	-
160.000	-	-	-
140.000	-	-	-
125.000	-	-	-
115.000	-	-	-
105.000	-	-	-
92.000	92.000	92.000	92.000
80.000	80.000	80.000	-
72.000	-	-	-
67.000	67.000	67.000	67.000
57.000	57.000	57.000	-
52.000	52.000	52.000	52.000
46.000	-	-	-
40.000	40.000	40.000	-
36.000	36.000	36.000	36.000
33.000	33.000	33.000	-
29.000	-	-	-
24.000	24.000	24.000	-
18.000	19.000	19.000	-
13.500	13.500	13.500	-
12.500	-	-	-

Tabelle 33

4.4.2 Immunoblots mit Anti Arc 4 Hyperimmunserum (4HI)

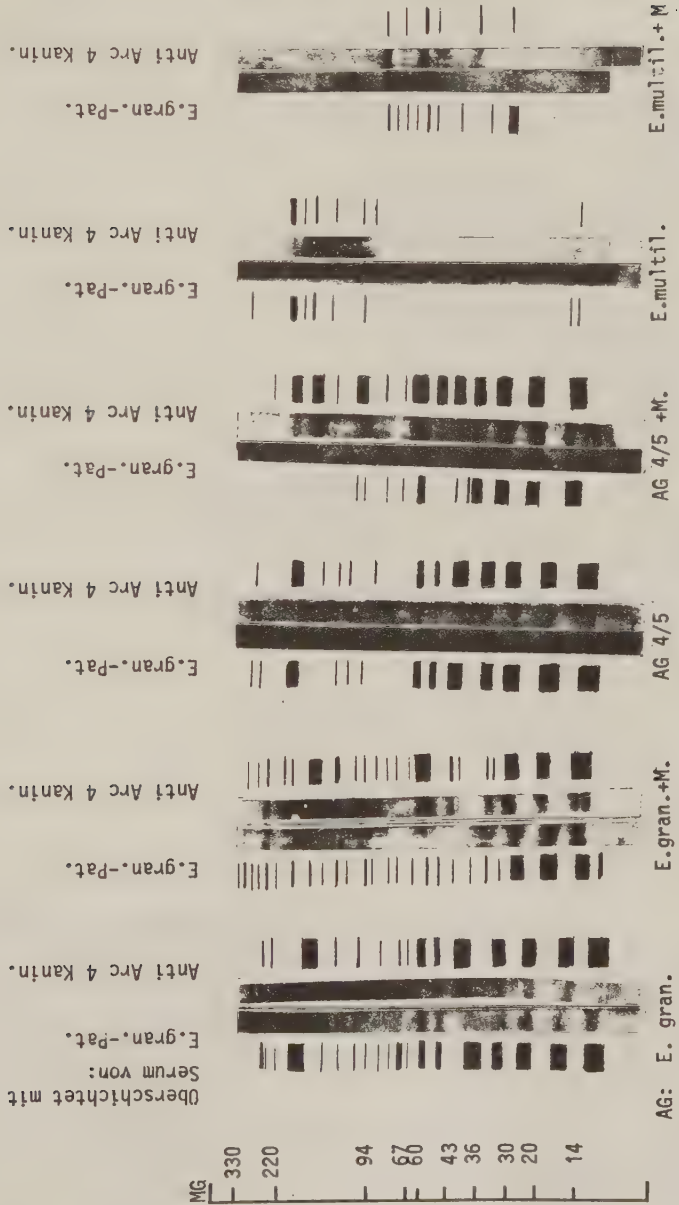


Abbildung 36

AG: E. gran. überschichtet mit Serum von E. gran. Anti Pat. Arc 4 Kanin.	AG: E. gran.+M Überschichtet mit Serum von E. gran. Anti Pat. Arc 4 Kanin.	AG 4/5 Überschichtet mit Serum von E. gran. Anti Pat. Arc 4 Kanin.	AG 4/5 +M Überschichtet mit Serum von E. gran. Anti Pat. Arc 4 Kanin.	AG: E. multil. Überschichtet mit Serum von E. gran. Anti Pat. Arc Kanin.	AG: E. multil.+M Überschichtet mit Serum von E. gran. Anti Pat. Arc 4 Kanin.
255.000	285.000	255.000	-	270.000	85.000
240.000	270.000	240.000	-	180.000	75.000
230.000	260.000	165.000	-	170.000	70.000
180.000	240.000	130.000	-	150.000	62.000
-	220.000	115.000	92.000	125.000	57.000
150.000	180.000	105.000	-	95.000	52.000
115.000	-	96.000	80.000	-	43.000
105.000	160.000	-	67.000	13.000	-
96.000	140.000	62.000	57.000	11.500	36.000
90.000	125.000	49.000	52.000	-	27.000
82.000	115.000	40.000	-	-	-
77.000	105.000	30.000	40.000	46.000	-
67.000	-	24.000	33.000	40.000	-
62.000	92.000	17.000	31.000	31.000	-
49.000	80.000	12.000	24.000	24.000	-
-	72.000	-	19.000	19.000	-
37.000	67.000	72.000	13.500	13.500	-
29.000	57.000	67.000	-	-	-
22.500	52.000	57.000	-	-	-
16.500	46.000	52.000	-	-	-
12.000	40.000	40.000	-	-	-
-	36.000	38.000	-	-	-
-	33.000	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	29.000	31.000	-	-	-
-	24.000	29.500	-	-	-
-	24.000	24.500	-	-	-
-	18.000	18.000	-	-	-
-	13.500	13.500	-	-	-
-	12.500	-	-	-	-

4.4.3 Immunoblots mit monoklonalen Antikörpern gegen Arc 5 Antigen (MAB 5)

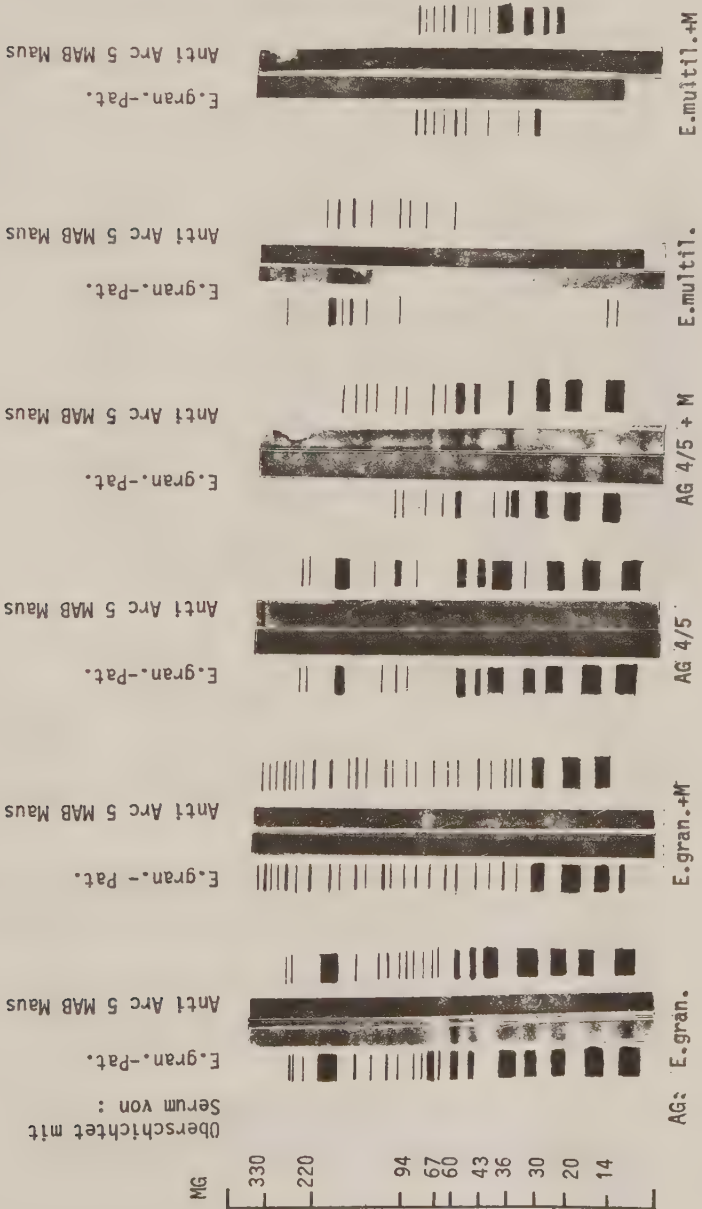


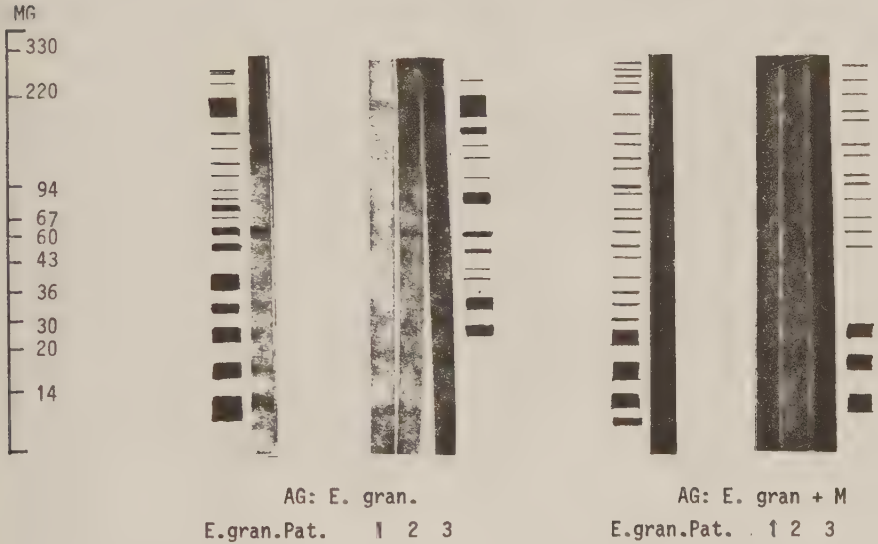
Abbildung 37

AG: E. gran. Oberschichtet mit Serum von E.gran. Anti Pat. Arc 5 MAB Maus	AG: E. gran. + M. Oberschichtet mit Serum von E.gran. Anti Pat. Arc 5 MAB Maus	AG 4/5 Oberschichtet mit Serum von E.gran. Anti Pat. Arc 5 MAB Maus	AG 4/5 + M. Oberschichtet mit Serum von E.gran. Anti Pat. Arc 5 MAB Maus	AG: E.multil. Oberschichtet mit Serum von E.gran. Anti Pat. Arc 5 MAB Maus	AG: E.multil. + M. Oberschichtet mit Serum von E.gran. Anti Pat. Arc 5 MAB Maus
255.000	285.000	255.000	-	270.000	85.000
240.000	270.000	240.000	-	180.000	75.000
230.000	260.000	165.000	-	170.000	70.000
180.000	240.000	-	-	150.000	62.000
150.000	220.000	115.000	92.000	125.000	57.000
115.000	185.000	105.000	80.000	95.000	52.000
105.000	160.000	96.000	67.000	80.000	46.000
96.000	140.000	62.000	57.000	-	-
-	125.000	49.000	52.000	-	-
90.000	115.000	40.000	49.000	13.000	43.000
82.000	105.000	32.000	40.000	11.500	40.000
77.000	92.000	-	33.000	-	-
67.000	80.000	30.000	31.000	-	32.000
62.000	72.000	24.000	24.000	-	27.000
49.000	67.000	17.000	19.000	-	-
-	57.000	12.000	13.500	-	24.000
37.000	52.000	-	-	-	-
29.000	46.000	-	33.000	-	-
22.500	40.000	-	31.000	-	-
16.500	36.000	-	24.000	-	-
17.000	33.000	-	19.000	-	-
12.500	31.000	-	13.500	-	-
-	29.000	-	-	-	-
-	24.000	-	-	-	-
-	18.000	-	-	-	-
-	13.500	-	-	-	-
-	12.500	-	-	-	-

4.4.4 Immunoblots mit Antiseren (Human, Ziege, Schaf) gegen P_1 -Antigen

4.4.4.1 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS

4.4.4.2 E. granulosus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol



- 1 = Anti P_1 Human
2 = Anti P_1 Ziege
3 = Anti P_1 Schaf

Abbildung 38

AG: E. gran.

überschichtet mit

Serum von E.gran.-Pat.	Anti P ₁ Human	Anti P ₁ Ziege	Anti P ₁ Schaf
255.000	-	-	-
240.000	-	-	-
230.000	230.000	230.000	230.000
180.000	180.000	180.000	180.000
150.000	150.000	150.000	150.000
115.000	115.000	115.000	115.000
105.000	105.000	105.000	105.000
96.000	96.000	96.000	96.000
90.000	-	-	-
82.000	82.000	82.000	82.000
77.000	-	-	-
67.000	-	-	-
62.000	62.000	62.000	62.000
49.000	49.000	49.000	49.000
37.000	37.000	37.000	37.000
-	32.000	32.000	32.000
29.000	-	29.000	29.000
22.500	-	22.500	22.500
16.500	-	-	-
12.000	-	-	-

Tabelle 36

AG: E. gran. + M.

Oberschichtet mit

Serum von E.gran.-Pat.	Anti P ₁ Human	Anti P ₁ Ziege	Anti P ₁ Schaf
285.000	-	-	-
270.000	270.000	270.000	270.000
260.000	-	-	-
240.000	240.000	240.000	240.000
220.000	220.000	220.000	220.000
185.000	185.000	185.000	185.000
-	170.000	170.000	170.000
160.000	-	-	-
140.000	140.000	140.000	140.000
125.000	125.000	125.000	125.000
115.000	110.000	110.000	110.000
105.000	105.000	105.000	105.000
92.000	-	-	-
80.000	85.000	85.000	85.000
72.000	-	-	-
67.000	67.000	67.000	67.000
57.000	57.000	57.000	57.000
52.000	52.000	52.000	52.000
46.000	-	-	-
40.000	-	-	-
36.000	-	-	-
33.000	-	-	-
29.000	-	-	-
24.000	24.000	24.000	24.000
18.000	18.000	18.000	18.000
13.500	13.500	13.500	13.500
12.500	-	-	-

Tabelle 37

4.5 Immunoblot mit *Onchocerca volvulus*-Antigen

4.5.1 Vergleich von Filariose-, *E. granulosus*- und *E. multilocularis*-Patienten

4.5.1.1 *O. volvulus*-Antigen mit 1 % SDS

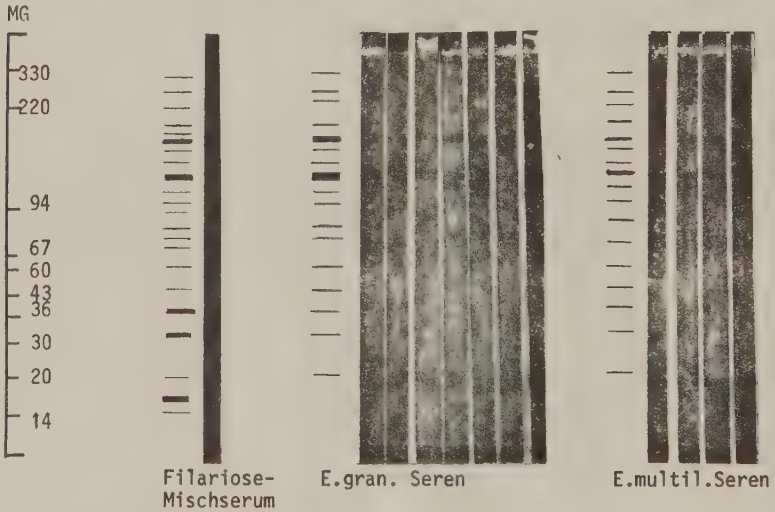


Abbildung 39

Filariose-Mischserum	E.gran. Seren	E.multil. Seren
315.000	315.000	315.000
290.000	290.000	290.000
220.000	220.000	220.000
200.000	200.000	200.000
180.000	180.000	180.000
160.000	-	-
150.000	150.000	150.000
140.000	140.000	140.000
125.000	125.000	125.000
110.000	110.000	110.000
100.000	100.000	100.000
95.000	-	-
82.000	82.000	82.000
75.000	75.000	75.000
70.000	-	-
58.000	58.000	58.000
48.000	48.000	48.000
38.000	38.000	38.000
31.000	31.000	31.000
21.500	21.500	21.500
18.000	-	-
15.500	-	-

Tabelle 38

4.5.1.2 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol

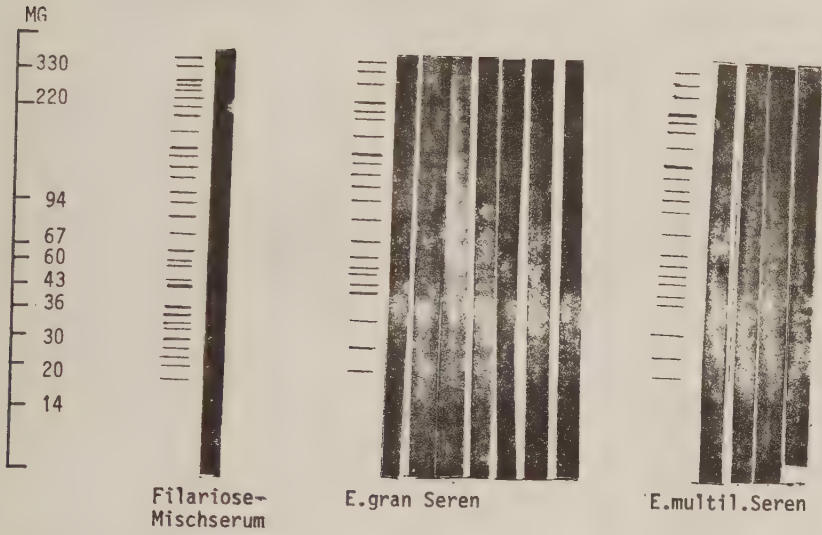


Abbildung 40

Filariose- Mischserum	E.gran. Seren	E.multil. Seren
340.000	340.000	340.000
330.000	330.000	330.000
290.000	290.000	290.000
280.000	-	-
260.000	-	-
250.000	250.000	250.000
220.000	220.000	220.000
200.000	200.000	200.000
180.000	180.000	180.000
150.000	150.000	150.000
145.000	145.000	140.000
130.000	130.000	130.000
120.000	120.000	120.000
105.000	105.000	105.000
94.000	-	-
82.000	82.000	82.000
70.000	70.000	70.000
60.000	60.000	60.000
54.000	54.000	54.000
52.000	52.000	52.000
46.000	46.000	46.000
43.000	43.000	43.000
36.000	36.000	36.000
33.000	33.000	33.000
31.000	-	-
29.000	-	-
27.000	27.000	27.000
24.000	-	-
22.500	-	-
21.000	21.000	21.000
18.500	-	-

Tabelle 39

4.5.2 Vergleich von Onchozerkose-, D. perstans-, Strongyloidiasis- und Ankylostomiasis-Patienten

4.5.2.1 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS



Abbildung 41

Onchozerkose	D. Perstans	Strongyloidosis	Ankylostomiasis
330.000	330.000	-	-
180.000	180.000	180.000	180.000
170.000	-	-	160.000
150.000	150.000	150.000	-
125.000	125.000	125.000	125.000
115.000	115.000	-	-
105.000	105.000	-	-
85.000	85.000	85.000	85.000
77.000	-	-	-
-	67.000	67.000	67.000
58.000	58.000	58.000	-
52.000	-	-	-
46.000	46.000	46.000	46.000
37.000	37.000	37.000	37.000
25.000	25.000	-	-
21.000	21.000	-	-
19.000	-	-	-

Tabelle 40

4.5.2.2 O. volvulus-Antigen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoethanol



Abbildung 42

Onchozerkose	D. Perstans	Strongyloidosis	Ankylostomiasis
310.000	-	-	310.000
300.000	-	-	-
270.000	270.000	270.000	270.000
250.000	-	-	250.000
210.000	210.000	210.000	210.000
190.000	-	-	-
175.000	-	-	-
170.000	-	170.000	-
160.000	-	-	-
140.000	140.000	-	-
-	130.000	130.000	130.000
120.000	120.000	120.000	120.000
115.000	-	-	-
105.000	105.000	105.000	105.000
90.000	-	-	-
82.000	-	-	82.000
77.000	77.000	-	-
-	-	-	67.000
58.000	58.000	-	-
-	56.000	56.000	56.000
48.000	48.000	-	48.000
-	44.000	44.000	-
-	42.000	42.000	42.000
40.000	40.000	-	-
36.000	36.000	36.000	36.000
32.000	-	-	-
-	-	29.000	-
-	26.000	-	-
20.000	21.000	-	-
17.500	17.500	17.500	17.500
16.000	16.000	-	-
14.000	14.000	14.000	14.000
12.500	-	-	12.500

5. DISKUSSION

5.1 Zuverlässigkeit und Aussagekraft der Untersuchung

5.1.1 Antigenherstellung

Bei der Gewinnung der Antigene ist mit einem unterschiedlichen Anteil an Wirtsmaterial zu rechnen. Hydatidenflüssigkeit von *E. granulosus* enthält in erheblichem Umfang Wirtsproteine. Dabei handelt es sich im wesentlichen um Serumproteine (Albumin, α -, β - und γ -Globuline). Der Anteil der beiden hauptsächlichen Parasitenantigene (AG 4 und 5 nach Capron) liegt nur zwischen 2 und 10 % (53).

Es wird diskutiert, ob geographisch unterschiedliche Stämme von *E. granulosus* vorkommen, die sich durch eine Bevorzugung bestimmter Zwischenwirte auszeichnen und bei den verschiedenen Wirten Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zeigen (40, 67, 70). Daher wurden Antigene von verschiedenen Wirtsspezies (Zwischenwirte) und von verschiedener geographischer Herkunft verglichen.

Kreuzreaktionen mit Wirtsproteinen sind nicht auszuschließen. Um Wirtsproteine weitgehend zu entfernen, wurde eine Reinigung des *E. granulosus*-Antigens nach Oriol (52) durchgeführt, wobei eine Entfernung der Wirtsproteine bis auf ca. 1 - 2 % erreicht wird. Zudem ist ein parasitäres Antigen bei *E. granulosus* beschrieben worden, das antigenetische Verwandtschaft mit dem Blutgruppenantigen P_1 besitzt und insbesondere bei Personen ohne dieses Blutgruppenmerkmal (P_2) zur Bildung von Antikörpern führen kann. Daher wurde eine Charakterisierung der dafür in Frage kommenden Antigene mittels spezieller Anti P_1 -Seren durchgeführt.

Zur Gewinnung von *E. multilocularis*-Antigen wurde ein bereits seit 1976 auf Mäusen passagierter Stamm verwendet. Andere Stämme zum Vergleich standen nicht zur Verfügung. Eine etwaige Veränderung der Antigenzusammensetzung durch die mehrfachen Passagen nur im Zwischenwirt ist nicht auszuschließen. Ein Vergleich mit frisch

isoliertem (nicht passagiertem) *E. multilocularis*-Metacestodengewebe war nicht möglich.

Bei der Antigengewinnung wurde Wirtsmaterial, soweit makroskopisch sichtbar, entfernt. Das Antigen ist aber sicher nicht frei von Wirtsgewebe, da eine Adhäsion von Wirtsgewebe an das Parasitenmaterial nicht auszuschließen ist und sowohl im perizystischen Gewebe als auch in der gallertigen Grundsubstanz Wirtsbestandteile enthalten sind. Es handelt sich hier ebenfalls in erster Linie um den Serumproteinen entsprechende Wirtsproteine. Methoden zur Entfernung oder Reduzierung von Wirtsproteinen wurden nicht durchgeführt.

Bei der Gewinnung von *O. volvulus*-Antigen wurde Wirtsmaterial durch die enzymatischen Verdauungsmethoden weitgehend entfernt. Eine Adhäsion von Wirtsproteinen (z.B. Immunglobulinen) sowie die in-vivo-Inkorporation von Wirtsproteinen ist nicht auszuschließen. Insgesamt ist jedoch mit einem prozentual geringen Anteil an Wirtsproteinen in dem auf diese Weise hergestellten Antigen zu rechnen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß Bestandteile der Filarienkutikula bei dieser Antigengewinnung verlorengehen.

Die Verarbeitung aller Antigene erfolgte sofort nach Gewinnung oder nach kontinuierlicher Lagerung bei -20°C , so daß eine Denaturierung oder mikrobielle Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden kann.

5.1.2 Seren

Die Seren waren nach Abnahme bei -20°C über den Zeitraum von bis zu 3 Jahren gelagert worden. Dabei handelte es sich um Seren von Patienten mit parasitologisch gesicherten Monoinfektionen, außer bei den Onchozerkose-Patienten, bei denen eine vorausgehende oder gleichzeitige Infektion mit anderen Parasiten, insbesondere Intestinalparasiten und anderen Filarien (*D. perstans*) anzunehmen

ist. Zudem sind diese Seren im Rahmen anderer Untersuchungen 1 bis 3 Mal aufgetaut worden.

Da das Hyperimmunserum, das durch Hitzedenaturierung von Antigen 5 hergestellt wurde, nur mittels der im Vergleich zu enzym-immunologischen Methoden wenig empfindlichen Immunelektrophorese überprüft wurde, ist das Vorhandensein geringer Mengen von Antikörpern gegen Antigen 5 nicht auszuschließen. Außerdem war zu erwarten, daß in diesem Serum Antikörper gegen zahlreiche weitere Parasiten- und Wirtsantigene enthalten sind, da das zur Immunisierung benutzte AG 4/5 nur eine Anreicherung dieser Antigene darstellt (s.o).

5.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblot

Das Gradientengel wirkt im Gegensatz zu einem Gel mit kontinuierlicher Polyacrylamidkonzentration zusätzlich als Molekularsieb, so daß sich insbesondere bei längeren Trennungszeiten eine höhere Reproduzierbarkeit ergibt, da die jeweiligen Makromoleküle beim Erreichen des ihrem Molekulargewicht entsprechenden Bereichs nicht weiterwandern. Durch die Zugabe von SDS und/oder Mercaptoethanol sowie durch die Erhitzung auf 65°C wird eine Denaturierung oder Reduzierung von Proteinen erreicht, so daß eine irreversible Denaturierung antigener Epitope möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß es nach elektrophoretischem Transfer und Entfernung von SDS bzw. Mercaptoethanol zu einer Renaturierung mit Erhaltung der meisten antigenen Epitope kommt. Der Einfluß von SDS und Mercaptoethanol auf die Antigenität der einzelnen Parasitenproteine konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Die Molekulargewichtsbestimmung ist auch bei Verwendung von Standardproteinen mit einer Abweichung von 4 % (Bereich 0 - 11 %) möglich (31), so daß die Molekulargewichte mit einer Genauigkeit von 2 - 5 % angegeben werden konnten.

Bei der Darstellung der Proteine mittels Coomassie-Blau- und Silber-Färbung waren bei der Silber-Färbung deutlich mehr Proteinbanden nachweisbar. Nach der Anleitung der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories 1982, Bulletin 1089) ist die Silber-Färbung um das 10 - 50-fache empfindlicher als die Coomassie-Blau-Färbung, wobei jedoch eine Abhängigkeit von der Art der Proteine und von dem Molekulargewicht besteht. Bestimmte Proteine ließen sich in der Silber-Färbung schlecht darstellen, so daß ein Recycling notwendig war, um die Anfärbung der Proteinbanden zu verstärken.

Beim elektrophoretischen Transfer vom Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose-Folie (Western-Blot) besteht die Gefahr, daß vor allem Proteine mit kleinem Molekulargewicht durch die Nitrocellulose-Membran durchdiffundieren. Um auszuschließen, daß dadurch Proteine verlorengehen, wurde dies mit einer zweiten Nitrocellulose-Folie kontrolliert. Da beim Transfer eine gewisse Querdiffusion stattfindet, besteht die Möglichkeit, daß eng beieinander liegende Proteinbanden auf der Nitrocellulose-Folie gegenüber dem Polyacrylamidgel verbreitert sind und nicht mehr eindeutig voneinander abgrenzbar sind bzw. schwächere Banden überdecken können. Proteine, deren isoelektrischer Punkt über dem pH des Blot-Puffers (pH 8,3) liegt, können ungenügend oder gar nicht auf die Nitrocellulose-Folie übertragen werden.

Im Immunoblot wurde ausschließlich anti-human IgG-Konjugat verwendet, so daß Antikörper anderer Immunglobulinklassen nicht erfaßt wurden. Um eine unspezifische Adsorption der untersuchten Seren und des Enzymkonjugates auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollen durchgeführt.

5.2 Vergleich mit anderen Untersuchungen

Mit 4-30%igem Polyacrylamidgel ließen sich in der vorliegenden Untersuchung bei SDS-behandelten Proben von E. granulosus-Antigen 14 Proteine mit einem Molekulargewicht von 18.500 - 210.000 in

der Coomassie-Blau-Färbung und 21 (MG 12.500 - 210.000) in der Silber-Färbung darstellen. Durch die zusätzliche Behandlung der Proben mit dem Reduktionsmittel Mercaptoethanol kommt es zu einer Reduktion von SH-Gruppen mit Spaltung von durch diese Brückenbindung verbundenen Proteinbestandteilen, so daß mehr Proteine bzw. Untereinheiten nativer Proteine darstellbar sind, nämlich in der Coomassie-Blau-Färbung 22 (MG 12.500 - 130.000) und in der Silber-Färbung 33 (MG 12.500 - 310.000). Dottorini et al. (23) fanden bei der Auftrennung von mit SDS und Mercaptoethanol behandelter Hydatidenflüssigkeit vom Schaf in einem 15%igen Polyacrylamidgel nur 7 Proteine (MG ca. 20.000 - 69.000) in der Coomassie-Blau-Färbung. Allerdings ist die Trennschärfe und der Molekulargewichtsbereich in einem homogenen Gel deutlich niedriger als in einem Gradientengel.

Als Antigen 5 wird von Dottorini et al. (23) ein Protein mit einem Molekulargewicht von 69.000 identifiziert. Von Piantelli et al. (53) wird dieses Antigen in homogenen SDS-Gelen von 5 %, 7,5 % und 12,5 % in Hydatidenflüssigkeit mit SDS-Behandlung (ohne Mercaptoethanol) mit einem Molekulargewicht von 67.000 identifiziert. Bei Behandlung des Antigens mit SDS und Mercaptoethanol stellt er einen Zerfall in zwei Bruchstücke mit einem Molekulargewicht von 47.000 und 20.000 fest. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse kann darauf beruhen, daß von beiden Untersuchern eine Erhitzung der Proben auf 100°C über einen unterschiedlichen Zeitraum (2 und 4 Minuten) erfolgt ist. Wie jedoch von mehreren Untersuchern (23, 41) gezeigt werden konnte, kommt es bei einer Erhitzung von Arc 5-Antigen auf 100°C zu einer von der Zeitdauer abhängigen Denaturierung und zumindest partieller Ausfällung. Daher ist es fraglich, ob in den so behandelten Proben noch gelöstes Arc 5-Antigen enthalten ist. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Proben daher nur auf 65°C (15 Minuten) erwärmt. Bei dieser Temperatur ist keine Denaturierung bzw. Ausfällung mit Verlust der Antigenität zu erwarten.

Im Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern gegen Arc 5-Antigen (MAB 5) bei mit SDS und Mercaptoethanol behandelter Hydatiden-

flüssigkeit war in dieser Untersuchung ein Antigen mit einem Molekulargewicht von 33.000 nachzuweisen. Dieses Antigen war bei 17 von 19 *E. granulosus*-Patienten und bei allen *E. multilocularis*-Patienten darstellbar, während es bei sämtlichen Immunoblots von Patienten mit anderen Parasitosen (Filariose usw.), die eine Kreuzreaktion mit dem *E. granulosus*-Gesamtantigen zeigten, nicht vorhanden war. Bei diesem Antigen scheint es sich daher um eine immunogene Untereinheit des Arc 5-Antigens zu handeln. Im Bereich von 67.000 bzw. 69.000 (23, 53) war weder im mit SDS noch im mit SDS und Mercaptoethanol behandelten *E. granulosus*-Antigen eine konstante Bande im Immunoblot nachweisbar. Das Molekulargewicht des intakten Arc 5-Antigens wird von Dottorini et al. (23) zwischen 100.000 und 300.000, als verschiedene Aggregate einer monomeren Form mit dem Molekulargewicht von 69.000 angegeben, von Piantelli et al. (53) mit einem Molekulargewicht von 400.000 und mehr.

Mit einem polyklonalen Hyperimmunserum vom Kaninchen, das durch Erhitzen des Antigen 4/5 zur irreversiblen Denaturierung von Antigen 5 hergestellt wurde, fanden sich in der vorliegenden Untersuchung im Immunoblot keine Antikörper gegen das Arc 5 assoziierte Protein mit dem Molekulargewicht von 33.000, während sämtliche sonstigen Antigene unverändert erkannt wurden.

Die Auftrennung des gereinigten *E. granulosus*-Antigens (Antigen 4/5) im Immunoblot zeigte im wesentlichen dieselben Antigenbanden, so daß durch die Reinigung zwar eine Anreicherung der hauptsächlichsten Antigene (Arc 4 und Arc 5) erhalten wird, sonstige Antigene und Wirtsproteine (in der Coomassie-Blau- bzw. Silber-Färbung) weiterhin darstellbar sind.

Der Vergleich von Hydatidenflüssigkeit verschiedener geographischer- und Zwischenwirtsherkunft zeigte erhebliche Unterschiede der Proteinzusammensetzung, vor allem zwischen *E. granulosus*-Antigen vom Rind und vom Schaf, während Antigenextrakte vom Schaf von verschiedener Herkunft sich nur gering unterschieden. Das Arc 5 assoziierte Antigen (MG 33.000) war bei allen *E. granulosus*-Antigenen vorhanden.

Beim *E. multilocularis*-Antigen waren im Immunoblot bei der Überschichtung mit Seren von *E. granulosus*- und *E. multilocularis*-Patienten nur wenige inkonstante Antigenbanden in einem Molekulargewichtsbereich von 11.500 - 180.000 nachweisbar, so daß eine sinnvolle Auswertung nicht möglich war. Als Ursache hierfür muß eine geringe antigene Aktivität des verwendeten *E. multilocularis*-Antigens angesehen werden. In der Silber-Färbung stellten sich zahlreiche Proteinbanden dar.

Im Immunoblot fanden sich zwischen Seren von *E. granulosus*- und *E. multilocularis*-Patienten mit den homologen und heterologen Antigenen wie bereits oben angeführt, nahezu vollständige Kreuzreaktionen. Ein *E. granulosus*- oder *E. multilocularis*-spezifisches Antigen konnte nicht identifiziert werden. Dies entspricht im wesentlichen den Untersuchungen von Gottstein (27, 28, 29), nach denen lediglich ein weitgehend *E. multilocularis*-spezifisches Antigen mit einem Molekulargewicht von 54.000 identifiziert werden konnte, das sich jedoch nur im Immunoblot von isoelektrischen Fokussierungen oder in Immunpräzipitaten nachweisen ließ und das durch die Behandlung mit SDS bzw. SDS und Mercaptoethanol seine Antigenität verliert und somit mit der hier verwendeten Technik nicht nachweisbar ist.

Die Untersuchung im Immunoblot hinsichtlich Kreuzreaktionen mit anderen Parasiten zeigte vor allen Dingen bei Seren von Patienten mit Filariosen ausgedehnte Kreuzreaktionen, vor allem mit Antigenen im höheren Molekulargewichtsbereich (höher als 49.000 bei SDS bzw. höher als 40.000 bei SDS und Mercaptoethanol). Weniger ausgeprägt waren Kreuzreaktionen bei Schistosomiasis und Zystizerkose.

Bei verschiedenen tierischen Hyperimmunseren und einem hochtitrigen Humanserum gegen das Blutgruppenantigen P₁ waren neben mehreren unspezifischen, d. h. auch von Negativ-Seren erkannten Antigenen (s.u.) 2 (bei SDS behandeltem *E. granulosus*-Antigen) bzw. 5 (bei SDS und Mercaptoethanol behandeltem *E. granulosus*-Antigen) kreuzreagierende Antigene darstellbar, so daß mehrere Proteine

bzw. unter SDS und Mercaptoethanol entstehende Untereinheiten von mit P₁ kreuzreagierenden Antigenen in der Hydatidenflüssigkeit enthalten sind.

Schließlich konnten im Immunoblot Antikörper gegen Echinokokken-Antigene auch bei Negativ-Seren (Patienten ohne parasitäre Erkrankungen) nachgewiesen werden (insbesondere im Molekulargewichtsbereich zwischen 100.000 und 250.000), die auch bei nahezu allen anderen Seren (Patienten mit Echinokokkose oder sonstigen Parasitosen) und Hyperimmunsere darstellbar waren. Diese Antigene sind daher als unspezifisch zu betrachten und wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Da bei diesen Seren keine immunologische Bindung im Festphasen-ELISA gegen E. granulosus-Antigen auftrat, handelt es sich möglicherweise um unspezifische, nicht immunologische Bindungsreaktionen.

Bei O. volvulus-Antigen konnten im Immunoblot zahlreiche Kreuzreaktionen mit Seren von E. granulosus- und E. multilocularis-Patienten nachgewiesen werden. Lediglich 5 Antigene des SDS behandelten O. volvulus-Antigens bzw. 8 Antigene des SDS und Mercaptoethanol behandelten O. volvulus-Antigens zeigten sich als spezifisch für Filariose- (insbesondere Onchozerkose-) Patienten. Zu den Filariose-spezifischen Antigenen gehören auch 3 Antigene mit einem Molekulargewicht von 18.000, 21.000 und 24.000, die von Prod'Horn et al. (57) ebenfalls beschrieben worden sind. Zudem fanden sich im Immunoblot weniger ausgedehnte Kreuzreaktionen bei Seren von Patienten mit Strongyloidiasis und Ankylostomiasis.

5.3 Schlußfolgerungen

In der mit SDS und Mercaptoethanol behandelten Hydatidenflüssigkeit konnte ein Arc 5-Antigen assoziiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 33.000 nachgewiesen werden, gegen das nur bei Patienten mit zystischer und alveolärer Echinokokkose Antikörper bestanden.

Das Arc 5-Antigen assoziierte Protein (MG 33.000) konnte bei allen E. granulosus-Antigenen verschiedener geographischer- und Zwischenwirtsherkunft nachgewiesen werden.

Zusätzlich konnten bei mit SDS behandeltem E. granulosus-Antigen 4 Proteine (MG 12.000 - 29.000), bei mit SDS und Mercaptoethanol behandeltem Antigen 5 Proteine (MG 12.500 - 29.000) dargestellt werden, die nur bei Echinokokkose-Patienten nachweisbar waren.

Für E. granulosus- oder E. multilocularis-Infektionen spezifische Antigene konnten nicht identifiziert werden, so daß mit dieser Methode keine Differentialdiagnose zwischen beiden Arten möglich ist.

Mehrere Proteine bzw. Untereinheiten zeigten eine immunologische Kreuzreaktion mit dem Blutgruppenantigen P₁.

Insbesondere bei Seren von Patienten mit Filariosen zeigten sich ausgedehnte Kreuzreaktionen, vor allen Dingen mit höhermolekularen Echinokokken-Antigenen, weniger ausgedehnt auch bei Schistosomiasis und Zystizerkose.

Umgekehrt ergaben sich ausgedehnte Kreuzreaktionen bei Seren von Echinococcus-Patienten mit O. volvulus-Antigenen, weniger häufig auch bei Strongyloidiasis und Ankylostomiasis. Daneben fanden sich mehrere Filariose-spezifische Antigene.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung immunologischer Kreuzreaktionen zwischen *E. granulosus*- und *E. multilocularis*-Infektionen sowie anderen invasiven Wurminfektionen wurde *E. granulosus*-, *E. multilocularis*- und *O. volvulus*-Antigen in Polyacrylamid-Gradienten-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und nach elektrophoretischem Transfer enzymimmunologisch (Western-Blot) untersucht hinsichtlich der immunologischen Bindung von IgG-Antikörpern von Patienten mit zystischer und alveolärer Echinokokkose, Filariose, Schistosomiasis, Zystizerkose, Strongyloidiasis und Ankylostomiasis.

Dabei ergab sich, daß beim mit SDS und Mercaptoethanol behandelten *E. granulosus*-Antigen ein Arc 5 assoziiertes Antigen (MG 33.000) nachgewiesen werden konnte, gegen das nur bei Patienten mit zystischer und alveolärer Echinokokkose Antikörper vorhanden waren und das weder bei Filariose- noch bei Zystizerkose-Patienten darstellbar war. Dieses Antigen (MG 33.000) war auch bei allen *E. granulosus*-Antigenen verschiedener geographischer- und Zwischenwirterherkunft vorhanden. Zusätzlich waren 4 Antigene (MG 12.000, 16.500, 22.500, 29.000) bei mit SDS behandeltem *E. granulosus*-Antigen und 5 Antigene (MG 12.500, 13.500, 18.000, 24.000, 29.000) bei mit SDS und Mercaptoethanol behandeltem *E. granulosus*-Antigen nur bei Patienten mit zystischer und alveolärer Echinokokkose nachweisbar.

Eine serologische Differenzierung zwischen *E. granulosus*- und *E. multilocularis*-Infektionen ist mit dieser Methode nicht möglich.

Immunologische Kreuzreaktionen bei *E. granulosus*-Antigen waren vor allem bei Patienten mit Filariose, weniger ausgeprägt bei Schistosomiasis und Zystizerkose aufgetreten. Außerdem zeigten mehrere Antigene immunologische Kreuzreaktionen mit dem Blutgruppenantigen P₁. Auch bei Patienten ohne parasitäre Erkrankung

konnten Antikörper gegen Echinokokken-Antigene nachgewiesen werden, bei denen es sich möglicherweise um unspezifische, nicht immunologische Bindungsreaktionen handelt, da diese Seren keine immunologische Bindung im Festphasen-ELISA gegen *E. granulosus*-Antigen zeigten. Bei *O. volvulus* Antigen waren ausgedehnte Kreuzreaktionen mit Echinokokken-Seren vorhanden. Es waren auch hier mehrere Filariose-spezifische Antigene darstellbar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abrantes, P.; Avila, R.
Lancet, 2, 432 (1968)
- (2) Ambroise-Thomas P.:
Etude sero-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence.
Diss., Lyon (1969)
- (3) Ambroise-Thomas, P.; T.Kien Truong:
L'immunofluorescence dans le diagnostic serologique et le contrôle post-opérative de l'hydatidose humaine.
Cahiers Medicaux Lyonnaise (1970) 2955 - 2962
- (4) Ambroise-Thomas, P.; Desgeorges, P.T.; Monget, D.:
Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. 2. résultats pour la toxoplasmose, l'amibiase, la trichinose, l'hydatidose et l'aspergillose.
Bull. Wld. Hlth. Org. 56 (1978) 797 - 804
- (5) Apt, W.; Knierim, F.:
An evaluation of diagnostic tests for hydatid disease.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 19, (1970) 943 - 946
- (6) Apt, W.:
Avances en el diagnostico inmunologico de la hidatidosis.
Bol. Ofic. sanit. panamer. 79 (1975) 37 - 47
- (7) Bähr, R.:
Die Echinokokkose des Menschen.
Enke Verlag Stuttgart (1981)
- (8) Ben-Ismaïl, R.; Carme, B.; Niel, G.; Gentilini, M.:
Non-specific serological reactions with Echinococcus granulosus antigens. Role of anti P₁-antibodies.
Am. J. trop. Med. Hyg. 19 (1980), 239
- (9) Biguet, J.; Capron, A.; Tran Van Ky, P.; D'Haussey, R.:
Etude immunoélectrophoretique comparée des antigenes de divers helminthes.
C.R. Acad. Sci. 254 (1962) 3600
- (10) Bout, D.; Fruit, J.; Capron, A.:
Purification d'un Antigène spécifique de liquide Hydatique.
Ann. Immunol. 125 C (1974) 775 - 788
- (11) Bradstreet, C.M.:
A study of two immunological tests in the diagnosis and prognosis of hydatid disease.
J. Med. Microbiol. 2 (1969) 419 - 433

- (12) Burnette, W. N.:
"Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitro-cellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.
Anal. Biochemistry 112 (1981) 195 - 203
- (13) Cameron, G.L.; Stavely, J.M.:
Blood group P substance in hydatid cyst fluids.
Nature 179 (1957) 147
- (14) Capron, A.; Vernes, A.; Biguet, J.:
Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose.
SIMEP, Lyon (1967), 27
- (15) Capron, A.; Yarzabal, L.; Vernes, A.; Fruit, J.:
Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine.
Pathol. Biol. 18 (1970) 357
- (16) Casoni, T.:
Folia Clin. Chim. Microsc. Bologna 4, 5 (1911)
- (17) Cherubin, C.E.:
Nonspecific reactions to Casoni antigen.
Am. J. trop. Med. Hyg. 18 (1969) 387
- (18) Chordi, A.; Kagan, I.G.:
Identification and characterization of antigenetic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis.
J. Parasitol. 51 (1965) 63 - 71
- (19) Coltorti, E.A.; Varela-Diaz, V.M.:
IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid.
J. Parasitol. 58 (1972) 753 - 756
- (20) Coltorti, E.A.; Varela-Diaz, V.M.:
Echinococcus granulosus: penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cysts.
Exp. Parasitol. 35 (1974) 225 - 231
- (21) D'Amelio, R.; Pontesilli, O.; Dayal, R.; De Rosa, F.; Barnet, M.; Teggi, A.; Brighthouse, G.; Lambert, P.H.:
Characterization of parasite antigens from human hydatid cyst fluid by SDS-PAGE and IEF.
Med. Microbiol. Immunol. 174 (1985) 43 - 50
- (22) Disko, R.:
Epidemiologie, Diagnose und Therapie der Echinokokkose.
Ther. d. Gegenw. 116 (1977) 226 - 258
- (23) Dottorini, S.; Tassi, C.:
Echinococcus granulosus: Characterization of the Main Antigenic Component (Arc 5) of Hydatid Fluid.
Exp. Parasitology 43 (1977) 307 - 314
- (24) Farag, H.; Bout, D.; Capron, A.:
Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Biomedicine 23 (1975) 276 - 278

- (25) Garabedian, G.A.; Matossian, R.M.; Suidan, F.G.:
Correlative study of immunological tests for the diagnosis of
hydatid disease.
Amer. J. trop. Med. Hyg. 8 (1959) 67 - 71
- (26) Gentilini, M.; Pinon, J.M.:
Value of electrosynerosis (or immuno-electro-diffusion) on a
cellulose acetate membrane in hydatidosis diagnosis. Comparative
study with other precipitation tests.
Ann. Med. Interne (Paris), 123 (1972) 883
- (27) Gottstein, B.; Eckert, J.; Fey, H.:
Serological Differentiation between *Echinococcus granulosus* and
E. multilocularis Infections in Man.
Z. Parasitenkd. 69 (1983) 347 - 356
- (28) Gottstein, B.:
Isolation of an Antigen Fraction from *Echinococcus multilocularis*
with high species-specificity in ELISA and its Identification with
the Western Blotting Technique.
Elsevier Science Publishers B.V. (1983) 299 - 302
- (29) Gottstein, B.:
Purification and characterization of a specific antigen from
Echinococcus multilocularis.
Parasite Immunology 7 (1985) 201 - 212
- (30) Grabbe, E.; Kern, P.; Heller, M.:
Human *Echinococcosis* Diagnostic Value of Computed Tomography.
Tropenmed. Parasit. 32 (1981) 35 - 38
- (31) Hendrick, J.L.; Smith, A.J.:
Size and Charge Isomer Separation and Estimation of Molecular
Weights of Proteins by Disc Gel Electrophoresis.
Arch. of Biochem. and Biophysics 126 (1968) 155 - 164
- (32) Hess, U.; Eckert, J.; Fröhlich, A.:
Vergleich serologischer Methoden für die Diagnose der zystischen
und alveolären Echinokokkose des Menschen.
Schweiz. med. Wschr. 104, Nr. 24 (1974) 853- 859
- (33) Hinz, E.:
Organlokalisation des zystischen *Echinococcus* beim Menschen.
Münch. med. Wschr. 115 (1973) 922
- (34) Hultdt, G.; Johansson, G.O.; Lantto, S.:
Echinococcosis in Northern Scandinavia. Immune Reactions to
Echinococcus granulosus in Kautokeino Lapps.
Arch. Environ Health 26 (1973) 36 - 40
- (35) Hutchison, W.F.:
Serodiagnosis of *Echinococcus* Infection.
Amer. J. trop. Med. Hyg. 17 (1968) 752 - 755
- (36) Itô, K.; Horiuchi, Y.; Kumagai, M.; Ueda, M.; Nakamura, R.;
Kawanishi, N.; Kasai, Y.:
Evaluation of RAST as an immunological method for diagnosis of
multilocular *echinococcosis*.
Clin. exp. Immunol. 28 (1977) 407 - 412

- (37) Kagan, I.G.; Osiman, J.J.; Varela, J.C.; Allain, D.S.:
Evaluation of intradermal and serologic tests for the diagnosis of hydatid disease.
Amer. J. trop. Med. Hyg. 15 (1966) 172 - 179
- (38) Kagan, I.:
A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease
Bull. WHO 39, 25 (1968)
- (39) Kagan, I.G.:
Serodiagnosis of hydatid disease.
In *Immunology of Parasitic Diseases*, Cohen S. and Sadun, E, Eds,
Blackwell Scientific, Oxford, (1976) 130
- (40) Kumaratilake, L.M.; Thompson R.C.A.:
A standardized technique for the comparison of tapeworm soluble proteins by thin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels with particular reference to *echinococcus granulosus*.
Science Tools, Vol 26, No 2 (1979) 21 - 24
- (41) Lauriola, L.; Piantelli, M.; Pozzuoli, R.; Arru, E.; Musiani, P.:
Echinococcus granulosus: Preparation of Monospecific Antisera Against Antigens in Sheep Hydatid Fluid.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 240 (1978) 251 - 257
- (42) Levine, L.:
Micro-complement fixation.
Handbook of experimental immunology, hrsg. von D.W. Weir. Blackwell, Oxford/Edinburgh (1967)
- (43) Lingelbach, K.; Hinz, E.:
Echinococcus multilocularis: Identification of proteins inducing antibody formation in metacestode infection.
J. Helminthology 58 (1984) 1 - 6
- (44) Mahajan, R.C.; Ganguly, N.K.; Chitkara, N.L.; Agarwal, S.C.:
Comparativ evaluation of indirect haemagglutination intradermal and complement fixation tests in diagnosis of hydatid diseases.
Indian J. Med. Res. 61 (1973) 335 - 339
- (45) Mannweiler, E.; Thöle, A.; Lederer, I.:
Beiträge zur Immunodiagnostik der Echinokokkose des Menschen.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 238 (1977) 494 - 502
- (46) Mannweiler, E.; Felgner, P.; Lederer, I.:
Serum-Antikörper bei der zystischen und alveolären Echinokokkose.
Dtsch. med. Wschr. 104 (1979) 1139 - 1142
- (47) Morgan, W.T.J.; Watkins, W.M.:
Blood group P1 substances.
I. Chemical properties. *Proc. 9th Congr. Int. Soc. Blood Transfus.* (Mexico 1962), (1964) 225 - 229
- (48) Morgan, W.T.J.; Watkins, W.M.:
Blood group P1 substances.
II. Immunological properties. *Proc. 9th Congr. Int. Soc. Blood Transfus.* (Mexico 1962), (1964) 230 - 234

- (49) Musiani, P.; Piantelli, M.; Arru, E.; Pozzuoli, R.:
A solid phase radioimmunoassay for the diagnosis of human hydatidosis.
J. Immunol. 112 (1974) 1674
- (50) Musiani, P.; Piantelli, M.; Lauriola, L.; Arru, E.; Pozzuoli, R.:
Echinococcus granulosus: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids.
J. Clin. Pathology 31 (1978) 475 - 478
- (51) Norman, L.; Kagan, I.G.:
Preparation and evaluation of antigens for use in the serologic diagnosis of human hydatid disease. Identification and partial purification of the reactive elements in Echinococcus granulosus antigen prepared from sheep hydatid fluid.
J. Immunol. 96 (1966) 814 - 821
- (52) Oriol, R.; Williams, J.F.; Perez Esandi, M.V.; Oriol, Ch.:
Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 20 (1971) 569 - 574
- (53) Piantelli, M.; Pozzuoli, R.; Arru, E.; Musiani, P.:
Echinococcus granulosus: Identification of subunits of the major antigens.
J. Immunol. 119 (1977) 1382 - 1386
- (54) Pinon, J.M.:
Counterimmunoelectrophoresis in diagnosis of hydatid disease.
Lancet 1 (1976) 309
- (55) Pinon, J.M.; Dropsy, G.:
Etude immunologique des parasitoses humaines. Intérêt de l'ELISA (enzyme-linked-immuno-electro-diffusion-assay).
Pathol. Biol. 25 (1976) 13 - 27
- (56) Pinon, J.M.; Sulahian, A.; Remy, G.; Dropsy, G.:
Immunological Study of Hydatidosis.
Am. J. Trop. Hyg. 28(2) (1979) 318 - 324
- (57) Prod'Hon, J.; Lucius, R.; Kern, A.; Hébrard, G.; Diesfeld, H.J.:
Studies on the protein and antigen composition of individual female Onchocerca volvulus after collagenase digestion.
Trop. Med. Parasit. 36 (1985) 238 - 240
- (58) Pozzuoli, R.; Musiani, P.; Arru, E.; Piantelli, M.; Mazzarella, R.:
Echinococcus granulosus: Isolation and Characterization of Sheep Hydatid Fluid Antigens.
Exp. Paras. 32 (1972) 45 - 55
- (59) Pozzuoli, R.; Piantelli, M.; Perucci, C.; Arru, E.; Musiani, P.:
Isolation of the most immunoreactive Antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid.
J. Immunol. 115 (1975) 1459 - 1463

- (60) Quilici, M.; Assadourian, Y.; Ranque, P.:
Le diagnostic immunologique de l'hydatidose.
Med. Trop. Marseille 31 (1971) 207
- (61) Russi, S.; Ciracusano, A.; Vicari, G.:
Isolation and characterization of a blood P1 active carbohydrate
antigen of Echinococcus granulosus cyst membrane.
J. Immunol. 112 (1974) 1061 - 1069
- (62) Schantz, P.M.; Ortiz-Valqui, R.E.; Lumbreras, H.:
Nonspecific reactions with the intradermal test for hydatidosis
in persons with other helminth infections.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 24 (1975) 849 - 852
- (63) Schantz, P.M.; Shanks, D.; Wilson, M.:
Serologic cross-reactions with sera from patients with echino-
coccosis and cysticercosis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 (1980) 609 - 612
- (64) Schantz, P.M.; Kagan, I.G.:
Immunological investigation of echinococcosis (hydatidosis).
In Immunologic Investigations of Tropical Parasitic Diseases,
Houba, V., Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, (1980) 104
- (65) Schantz, P.M.:
Echinococcosis.
In Handbook Series in Zoonosis, J.H. Steele, CRC Press (1982)
231 - 277
- (66) Schulz-Key, H.; Jean, B.; Akpobona, B.; Dietrich, G.:
Maintenance of adult Onchocerca volvulus in vitro.
WHO/ONCHO/80.151 (nicht veröffentlicht)
- (67) Smyth, J.D.:
Strain differences in Echinococcus granulosus, with special
reference to the status of equine hydatidosis in the United
Kingdom.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71 (1977) 93 - 100
- (68) Sorice, F.; Delia, S.; Castagnari, L.:
Il test ELISA nella immunodiagnosi dell'idatidosi umana.
Osservazioni preliminari.
Boll. Inst. Sieroterico de Milan 56 (1977) 152
- (69) Speiser, F.:
Application of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for
the Diagnoses of Filariasis and Echinococcosis.
Tropenmed. Parasit. 31 (1980) 459 - 466
- (70) Thompson, R.C.A.:
Aspects of speciation in Echinococcus granulosus.
Vet. Paras. 4 (1978) 121 - 125

- (71) Todoroff, T.; Yurukova, D.:
Untersuchungen über die diagnostischen und prognostischen Möglichkeiten immunologischer Tests bei der Echinococcose.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 228 (1974) 402 - 413
- (72) Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J.:
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350 - 4354
- (73) Tsang, V.C.W.; Peralta, J.M.; Simons, A.R.:
Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Techniques (EITB) for Studying the Specificities of Antigens and Antibodies Separated by Gel Electrophoresis.
Meth. Enzymology 92 (1983) 377 - 391
- (74) Varela-Diaz, V.M.; Coltorti, E.A.; Ricardes M.I.; Guisantes, J.A.; Yarzabal, L.A.:
The immunoelctrophoretic characterization of sheep hydatid cyst fluid antigens.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 23 (1974) 1092 - 1096
- (75) Varela-Diaz, V.M.; Eckert, J.; Rausch, R.L.; Coltorti, E.A.; Hess, U.:
Detection of the Echinococcus granulosus Diagnostic Arc 5 in Sera from Patients with Surgically-Confirmed E. multilocularis Infection.
Z. Parasitenk. 53 (1977) 183 - 188
- (76) Varela-Diaz, V.M.; Coltorti, E.A.; D'Allessandro, A.:
Immunoelctrophoresis Tests Showing Echinococcus granulosus Arc 5 in Human Cases of Echinococcus vogeli and Cysticercosis-Multiple Myeloma.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 27 (1978) 554 - 557
- (77) Waldschmidt, U.:
Dissertation: Vergleich serologischer Tests zum Nachweis der Onchozerkose. (1983)
- (78) Williams, J.F.; Prezioso U.:
Latex Agglutination Test for Hydatid Disease Using Boerner Slides.
J. Parasitol. 56 (1970) 1253
- (79) Yarzabal, L.A.; Leiton, J.; Lopez-Lemes, M.H.:
The diagnosis of human pulmonary hydatidosis by the immunoelctrophoresis test.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 23 (1974) 662
- (80) Yarzabal, L.A.; Schantz, P.M.; Lopez-Lemes, M.H.:
Comparative sensitivity and specificity of the intradermal and immunoelctrophoresis tests for hydatid disease.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 24 (1975) 843
- (81) Yarzabal, L.A.; Bout, D.T.; Naquira, F.R.; Capron, A.R.:
Further observations on the specificity of antigen 5 of Echinococcus granulosus.
J. Parasitol. 63 (1977) 495

- (82) Young, W.K.; Heath, D.D.:
'Arc 5' antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus*
granulosus, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis*.
Parasite Immunology 1 (1979) 27 - 38

Herrn Professor Dr. med. W. Lang danke ich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit unter besten Bedingungen.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. med. Th. Löscher für seine fundierte wissenschaftliche Anleitung und stete Hilfsbereitschaft danken.

Recht herzlich möchte ich mich bei Frau E. Nägele und den Mitarbeitern des Instituts für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie für Ihre Hilfe und Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Am 25.1.1953 wurde ich als Tochter der Eheleute Franz-Xaver Meier und Gerta Meier, geb. Hager in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule von 1959 - 1965 und der Städt. Riemerschmid Handelsschule von 1965 - 1969 schloß ich dort mit der Mittleren Reife ab. Von 1973 bis 1977 besuchte ich das Städt. Abendgymnasium München und legte dort die Reifeprüfung ab.

Von 1969 bis 1976 arbeitete ich als Sekretärin bei der Firma MBB in Ottobrunn.

Im Sommersemester 1978 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität in München und erhielt im Dezember 1984 die Approbation als Ärztin.

Ab Januar 1973 fertigte ich am Institut für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München die vorliegende Disseration an.

Seit 1.11.1985 bin ich an o.g. Institut als wissenschaftliche Angestellte tätig.

